



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIÓLOGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
LIC. QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**Evaluación del efecto neuroprotector de Fenobarbital y WIN en
el modelo de epilepsia inducida por Pentilentetrazol (PTZ) en
ratones CD1**

Perteneciente al proyecto

Evaluación de Productos Relacionados con la Salud

Alumna

Jessica Paola León Mora

Matrícula

2152025648

Asesores: Dra. Tomasa Verónica Barón Flores No. Económico: 26848
Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda No. Económico 16190

Lugar de realización

Laboratorio de Neurofarmacología Molecular de la UIDIS en la UAM-X

Fecha de inicio: 16 de Octubre del 2018

Fecha de término: 15 de Abril del 2019

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	3
1.- EPILEPSIA.....	3
1.2 Clasificación de las epilepsias.....	6
1.3.- Crisis generalizadas.....	7
1.4.- Convulsiones generalizadas.....	8
1.4.1.- Convulsiones tónico-clónicas.....	8
1.4.2.- Convulsiones focales.....	8
1.4.3.- Desconocidas.....	8
1.5.- Pruebas en animales.....	9
1.6.- Tratamiento.....	9
1.6.1.- Fenobarbital.....	9
1.6.1.1 Farmacocinética.....	10
1.6.1.2 Farmacodinamia.....	11
2.- CANNABINOIDES.....	12
3.- WIN 55.212-2.....	13
4.- MODELO PENTILENTETRAZOL (PTZ).....	14
5.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1.- Diseño del estudio.....	15
5.2.- Animales.....	15
5.3 Análisis estadístico.....	16
6.- RESULTADOS.....	16
7.- CONCLUSIÓN.....	19
8.- REFERENCIAS.....	20

INTRODUCCIÓN

La epilepsia, depresión y ansiedad son afecciones del Sistema Nervioso Central (SNC) que causan sufrimiento y morbilidad entre la población mexicana. Si bien, existen fármacos para su tratamiento, en ocasiones estos resultan ineficaces y promueven efectos adversos que conllevan a la falta de apego por parte del paciente.

Debido al reciente aumento de casos en enfermedades crónico-degenerativas a nivel mundial, la necesidad de fármacos innovadores ha aumentado de manera considerable; es por esto, que la industria Químico-Farmacéutica se ha visto obligada a buscar y/o crear distintas alternativas naturales que sean seguras y eficaces para el tratamiento de dichas patologías.

El estudio de nuevas alternativas terapéuticas, como los cannabinoides, es importante, debido a su creciente uso en diversas patologías, ya que podrían ser muy útiles en el tratamiento de algunos síntomas y signos de epilepsia, ansiedad, párkinson, etc.

Por lo anterior, el presente trabajo planea evaluar la actividad anticonvulsiva de Fenobarbital y medir el nivel de protección proporcionado por WIN 55.212-2 al inducir crisis epilépticas mediante Pentilentetrazol. Al analizar los resultados obtenidos mediante pruebas estadísticas, se espera obtener un nivel favorable de protección contra las crisis inducidas.

1.- EPILEPSIA

La epilepsia es una enfermedad tan antigua que la peculiaridad de sus manifestaciones clínicas desencadenó la creencia de que era debida a causas sobrenaturales.¹

Es una alteración del sistema nervioso central (SNC) caracterizada por un incremento y sincronización anormales de la actividad eléctrica neuronal, que se manifiesta con crisis recurrentes y espontáneas, así como por cambios electroencefalográficos² y afecta en promedio del 0.5 al 2% de la población general.³

La epilepsia afecta a todos los grupos de edad y es uno de los trastornos neurológicos más comunes y discapacitantes. El diagnóstico preciso de las convulsiones es esencial, ya que algunos pacientes serán diagnosticados erróneamente con epilepsia, mientras que otros recibirán un diagnóstico incorrecto. De hecho, los errores en el diagnóstico son comunes y muchos pacientes no reciben el tratamiento correcto, que a menudo tiene graves consecuencias. Aunque muchos pacientes tienen control de las convulsiones usando un solo medicamento, otros requieren múltiples medicamentos, cirugía resectiva, dispositivos de neuromodulación o terapias dietéticas.⁴

Además, un tercio de los pacientes continuará teniendo convulsiones no controladas. La epilepsia puede afectar sustancialmente la calidad de vida debido a las convulsiones, el estado de ánimo comórbido y los trastornos psiquiátricos, los déficits cognitivos y los efectos adversos de los medicamentos. Además, las convulsiones pueden ser fatales debido a los efectos directos sobre las funciones autónomas y de excitación o debido a efectos indirectos como ahogamientos y otros accidentes.⁴

Esta es una condición clínica tratable. La meta del tratamiento es el logro de un estado libre de convulsiones, con efectos secundarios por el tratamiento que sean tolerables por el paciente y sus familiares. Los medicamentos anticonvulsivantes han demostrado tener una efectividad moderada dependiendo del tipo de epilepsia, pero difieren en cuanto a los efectos adversos que provocan y las interacciones medicamentosas que pueden presentar con otros medicamentos anticonvulsivantes o con medicamentos diversos de otros grupos farmacológicos.⁵⁻⁸

Convulsión no significa epilepsia. Podemos tener un episodio convulsivo por diversos factores (convulsiones provocadas): metabólicos, traumáticos, hipóxicos, privación de sueño, etc. Una convulsión no provocada es una sacudida aislada o en grupos que ocurren en un período de 24 horas en una persona mayor de 1 mes de edad, en ausencia de factores precipitantes. Entre las convulsiones no provocadas debemos considerar las convulsiones agudas sintomáticas, las cuales son episodios que se presentan luego de un daño sistémico o en estrecha asociación temporal con un insulto cerebral (convulsiones febriles, trauma craneano, infección, asfixia, agentes tóxicos,

tumor cerebral, craneotomía, etc.). Las convulsiones no provocadas pueden ser únicas o recurrentes. El riesgo de convulsiones recurrentes se incrementa luego de una segunda convulsión no provocada. Los factores de predicción más consistentes para la recurrencia son un EEG anormal y la presencia de un examen neurológico anormal.⁵⁻⁸

La epilepsia no necesariamente es una condición permanente en la vida de un individuo y se puede considerar resuelta si una persona ha estado libre de convulsiones por los últimos 10 años, con al menos 5 años libre de medicamentos anticonvulsivantes, o cuando esa persona ha pasado la edad de un síndrome epiléptico dependiente de la edad.^{5,6}

Hay tres tipos fundamentales de convulsiones (mejor llamadas crisis, por cuanto pueden acompañarse o no de convulsiones): las focales (antiguamente llamadas parciales), las generalizadas y las no clasificadas. Esta clasificación es elemental, ya que hay algunas que son mucho más complejas y existen más de 40 formas distintas de epilepsia.^{5,7}

Al descifrar la fisiopatología de la epilepsia, se ha avanzado en la comprensión de los eventos celulares y moleculares iniciados por los insultos patogénicos que transforman los circuitos normales en circuitos epilépticos (epileptogénesis) y los mecanismos que generan convulsiones (ictogénesis). El descubrimiento de >500 genes asociados con la epilepsia, ha llevado a nuevos modelos animales, diagnósticos más precisos y, en algunos casos, terapias dirigidas.⁷

Clasificación ILAE (Liga Internacional contra la Epilepsia) de la epilepsia (Scheffer, et al., 2017)

La explicación abarca tipo (s) de ataque definidos por su tipo de inicio (focal; generalizado; desconocido), luego tipo de epilepsia y en tercer lugar, síndrome de epilepsia. En algunos casos, solo el tipo de epilepsia será diagnosticable y no se aplicará el nombre del síndrome.⁹

La clasificación revisada también enfatiza la importancia de considerar la causa, o etiología, de la epilepsia del paciente desde la consulta inicial adelante. Presenta seis títulos generales para las etiologías (figura 1).⁹

Esta nueva clasificación proporciona una mejor comprensión de los tipos de convulsiones que padece la persona y la causa y el resultado probable a largo plazo de la epilepsia. La clasificación correcta también puede ayudar con la elección del tratamiento farmacológico y señalar la posibilidad de una cirugía de epilepsia, si no se obtiene un control óptimo de las convulsiones con medicamentos.⁹

1.2.- Clasificación de epilepsias

La clasificación pretende cubrir el desarrollo de la epilepsia a través de un rango global. Se asume, que el médico ya ha hecho un diagnóstico definitivo de una convulsión epiléptica y no pretende ser un algoritmo de diagnóstico para distinguir los eventos epilépticos de los no epilépticos. Siempre que sea posible, el diagnóstico debe tener en cuenta el tipo o los tipos de convulsiones, el tipo de epilepsia y el síndrome de epilepsia, así como la causa específica subyacente al problema (figura 1). Además, la ILAE en 2017 dio a conocer una clasificación más amplia y/o detallada de los tipos de crisis (figura 2).⁹

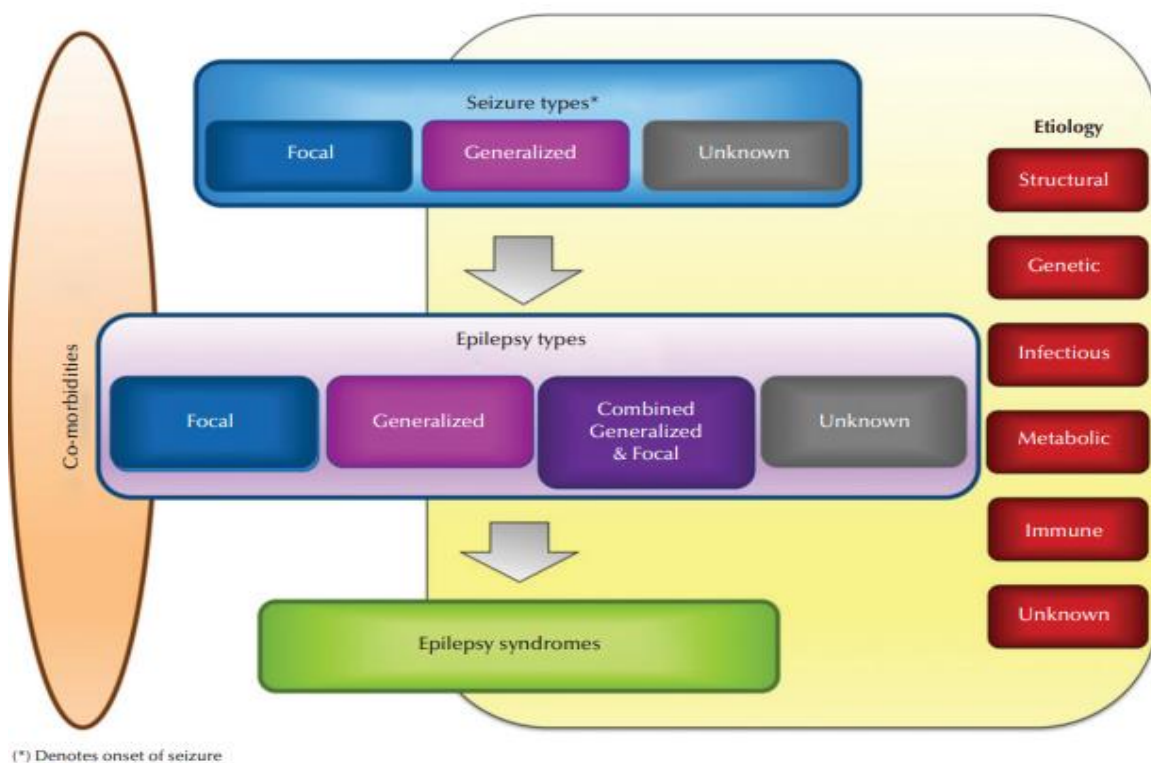


Figura 1. Marco de referencia de la clasificación de epilepsia.

Las convulsiones se pueden dividir en aquellas con inicio focal, inicio generalizado y comienzo desconocido. Algunas convulsiones focales pueden propagarse rápidamente para producir una convulsión tónico-clónica, anteriormente conocida como convulsión o convulsión "grand mal". Los tipos de epilepsia pueden ser focales, generalizados o ambos. En algunas circunstancias, esto no estará claro ("desconocido"). Muchos síndromes incluyen más de un tipo de convulsión.⁹

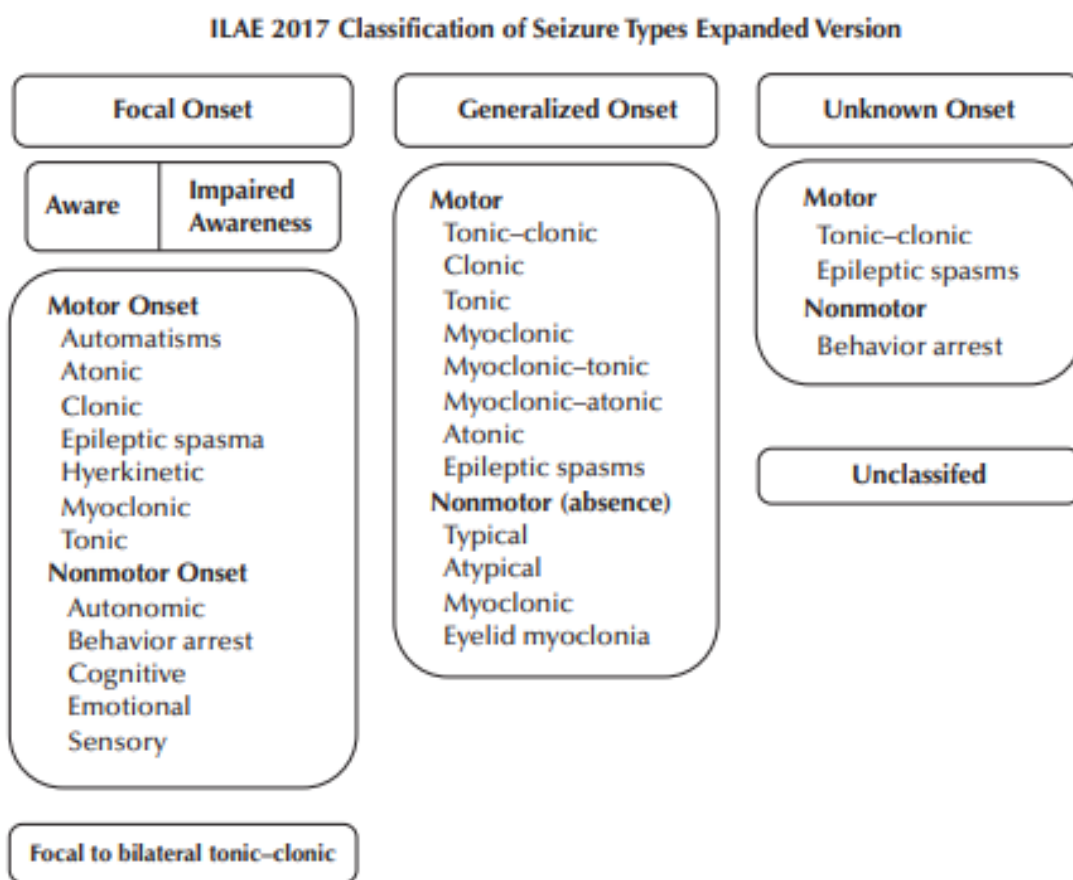


Figura 2. Clasificación extendida de las crisis epilépticas.

1.3.- Crisis generalizadas

Las descargas anómalas que generan crisis generalizadas se originan en la porción central del encéfalo y se extienden simultáneamente a toda superficie, en una interacción entre la corteza cerebral y el centro del encéfalo.¹⁰

La persona que se encuentra en esta situación rara vez sabe que va a producirse una crisis. Las descargas eléctricas generalizadas en el encéfalo siempre conducen a pérdida de la conciencia.¹⁰

Se han identificado los siguientes tipos de crisis generalizadas:

1.4.- Convulsiones generalizadas

1.4.1.- Convulsiones tónico-clónicas

Anteriormente conocidas como “gran mal” o “enfermedad de caída”. La persona cae al suelo sin advertencia, a veces con un grito. La respiración se detiene y los brazos y las piernas se tornan rígidos (fase tónica), luego de lo cual la persona comienza a temblar y sacudirse (fase clónica). Después la persona yace quieta, a menudo con el rostro azul, hasta que la respiración normal se reanuda sola. La mayoría de las personas caen en un sueño profundo después de una crisis, por un periodo más breve o prolongado. Esto, a menudo conduce al concepto equivocado de que siguen estando inconscientes, pero, de hecho, se trata sólo de un sueño muy profundo.¹⁰

1.4.2.- Convulsiones focales

En estos eventos, la actividad eléctrica anormal se origina en un lado del cerebro, aunque en algunas situaciones puede extenderse al otro lado más tarde en la convulsión. Según el sitio de origen de las descargas eléctricas anormales y el alcance y la velocidad de su propagación en el cerebro. La conciencia puede estar presente, reducida o ausente. A veces, hay sacudidas de un brazo y / o pierna. Los espasmos epilépticos también pueden tener un origen focal. La actividad eléctrica anormal puede pasar rápidamente de un ataque focal a un ataque tónico-clónico, afectando a ambos lados (bilateral), conocido como un ataque tónico-clónico focal a bilateral.⁹

1.4.3.- Desconocidas

Ocasionalmente, el médico no puede estar seguro de si la epilepsia es focal o generalizada. Esto es más común cuando hay un acceso limitado a los estudios y a las imágenes modernas del cerebro, como la resonancia magnética (MRI).⁹

En la figura 2 se muestra la clasificación operacional más amplia de los tipos de crisis.⁹

1.5.- Pruebas en animales

Los departamentos de investigación de las firmas farmacéuticas a menudo desarrollan nuevas sustancias químicas. Las pruebas en animales pueden determinar si el fármaco afecta las crisis epilépticas. Las pruebas se llevan a cabo en animales que tienen epilepsia congénita o en los que se ha provocado epilepsia. Si el fármaco parece ser eficaz, se realizan otros experimentos en animales con diferentes dosis cada día para determinar cuándo aparecen los efectos colaterales. Estos efectos se estudian y se evalúan sobre diferentes tiempos de crisis en diferentes especies de animales en un intervalo de tiempo determinado.¹⁰

1.6.- Tratamiento

La epilepsia, así como las crisis epilépticas pueden en la actualidad recibir un tratamiento con resultados aceptables. En la mayoría de los casos, las epilepsias de la infancia se curan en la pubertad.¹¹ Cuando la epilepsia se debe a una lesión claramente visible y esa lesión es eliminada quirúrgicamente, se reduce la intensidad y frecuencia o bien, en muchos casos, se cura la epilepsia.¹² Es por esto que antes de iniciar algún tratamiento, el individuo debe ser examinado para encontrar causas que se puedan eliminar y actuar sobre ellas.

En otros casos esto no es posible, ya sea porque no se ha encontrado ninguna causa o porque ésta no pueda ser eliminada, como es el caso de cicatrices, malformaciones en el cerebro o una predisposición inherente a las convulsiones. El objetivo en estos casos es la eliminación de los ataques por medio de medicamentos u operaciones quirúrgicas.¹³

1.6.1.- Fenobarbital

El fenobarbital (figura 3), un fármaco antiepiléptico efectivo, se ha utilizado desde principios del siglo XX.¹⁴ Su costo relativamente bajo y su relación costo-beneficio es favorable, la cual es más baja que la de cualquier otro medicamento antiepiléptico en uso actual¹⁵, esto hace que el medicamento sea accesible y adecuado para su uso en países de bajos y medianos ingresos, donde la rentabilidad a menudo reemplaza otras prioridades.

Además, la vida media del medicamento permite el uso de una sola dosis diaria, lo cual es conveniente.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el fenobarbital como tratamiento de primera línea para las convulsiones convulsivas en países con pocos recursos y lo incluye en sus Listas Modelo de Medicamentos Esenciales. En consecuencia, un suministro continuo de fenobarbital de calidad asegurada en formas de dosificación apropiadas debería estar disponible en todos los Estados Miembros de la OMS, debidamente acompañado de información sobre su uso.¹⁵

Para el tratamiento del status epiléptico, se utilizan como primera opción, las benzodiazepinas de acción rápida (diazepam o lorazepam). Si éstos fallan, se recurre a la fenitoína, con el fenobarbital como alternativa.¹⁶ Sin embargo, el fenobarbital sí es utilizado como primera opción, en los casos de convulsiones neonatales.¹⁷

1.6.1.1.- Farmacocinética

El fenobarbital tiene una biodisponibilidad oral de un 90%. La unión a proteínas plasmáticas se produce en un 40-60% de la concentración total presente en el plasma. Rápidamente se alcanza en cerebro una concentración igual a la plasmática debido a su afinidad por los lípidos y proteínas cerebrales. El volumen aparente de distribución es de 0.5 l/kg.¹⁸ Se metaboliza

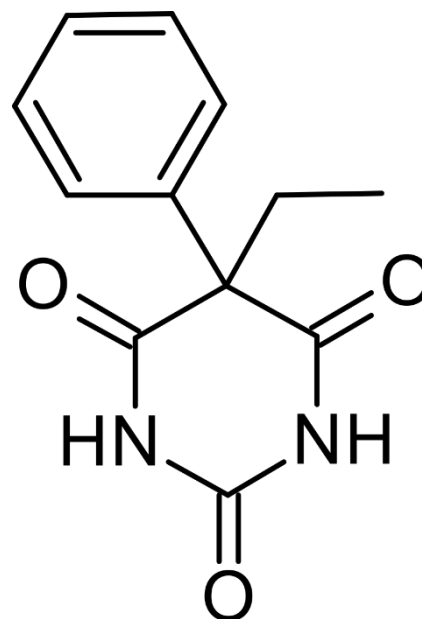


Figura 3. Estructura molecular de Fenobarbital.

principalmente en el hígado, principalmente vía hidroxilación y glucuronodización, e implica a muchas isozimas del sistema citocromo P-450 oxidasa, principalmente la CYP2C9 y en menor grado CYP2C19 y CYP2E1. También implica al sistema citocromo P450 2B6. El 25% de la dosis se excreta inalterada por el riñón, siendo esta excreción dependiente del pH y aumentando la fracción excretada con la alcalinización de la orina. El principal metabolito es el derivado p-hidroxifenílico, que se excreta en forma de glucurónido.¹⁸

1.6.1.2.- Farmacodinamia (mecanismo de acción)

Los efectos secundarios más importantes son efectos cognitivos y en el comportamiento. Al comienzo del tratamiento de la epilepsia suele aparecer cansancio que, por lo general, desaparece en el curso de este.

Cuando se administran barbitúricos por vía intravenosa, se puede producir depresión respiratoria grave, apnea, laringoespasma, broncoespasmo o hipertensión, especialmente si se administran con demasiada rapidez. El riesgo es mayor cuando se precede de la administración de un benzodiazepina (ej., diazepam rectal o iv). Una interrupción brusca tras un tratamiento prolongado puede provocar un síndrome de abstinencia. Puede producirse también reacción paradójica, agranulocitosis, trombopenia y tromboflebitis.¹⁹

El mecanismo de acción no está totalmente aclarado, y se supone que está relacionado en parte con el responsable de la acción hipnosedante. Es conocido que el fenobarbital actúa como estabilizante de la membrana neuronal por afinidad fisicoquímica por los lípidos de membrana, afectando a su permeabilidad y al flujo iónico; en efecto, presinápticamente reduce la entrada de calcio en la neurona y con ello la exocitosis de neurotransmisores, mientras que de modo no sináptico reduce la conductancia a los iones Na⁺ y K⁺, bloqueando las descargas repetidas (figura 4). Los estudios a nivel celular muestran depresión de la transmisión sináptica, sin disminución de la excitabilidad neuronal, pero esta acción no es uniforme en todas las neuronas. Además de esta acción "inespecífica" el fenobarbital actúa postsinápticamente facilitando la inhibición mediada por GABA (figura 4) y reduciendo la excitación

producida por glutamato y/o acetilcolina. A las dosis en que se emplea en la clínica este mecanismo postsináptico es el predominante.¹⁸

Interacciones de tipo farmacodinámico son las que tienen lugar con las bases xánticas (cafeína, teofilina), las cuáles reducen la eficacia protectora del fenobarbital frente al electroshock en ratón, haciéndose necesario un aumento de la dosis de antiepiléptico para controlar las convulsiones. Algunos antagonistas del calcio también dan lugar a interacción con el fenobarbital sin alteración de los niveles plasmáticos de ninguno de los fármacos; así flunarizina y nimodipino potencian el poder anticonvulsivante del fenobarbital en ratón, pero no ocurre esto con el verapamil o diltiazem.¹⁸

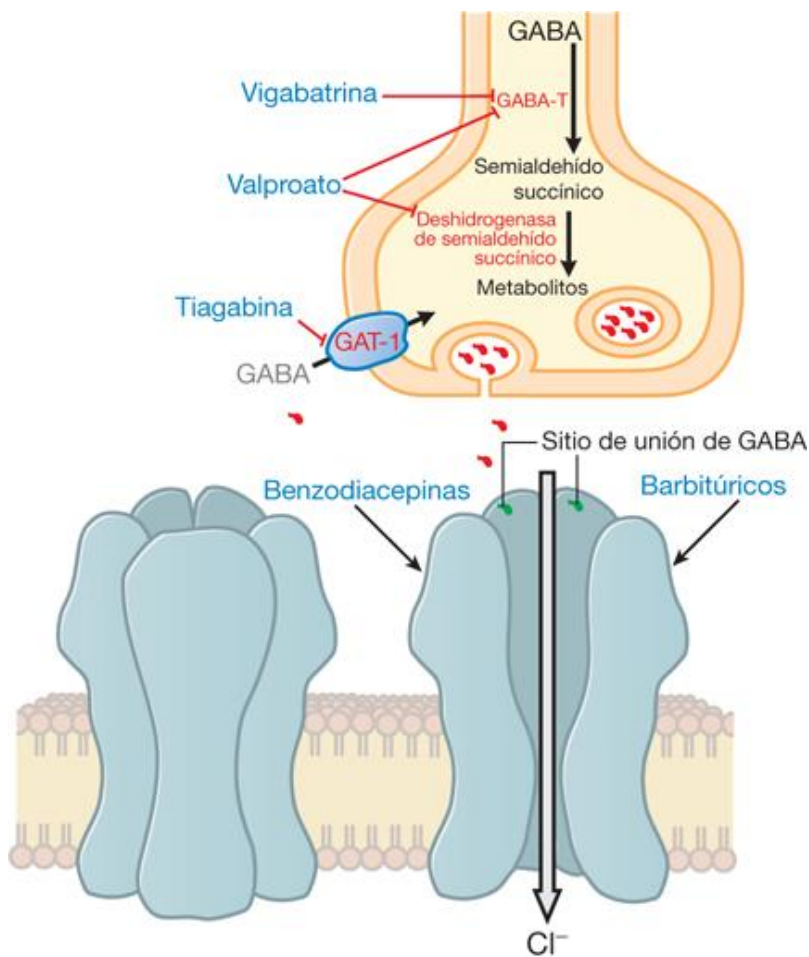


Figura 4. GABA sale de la Neurona GABAérgica y se une a los receptores GABA a postsinápticos, para que su unión aumente el tiempo de apertura del canal de Cl⁻, resultando en la depresión del SNC.²⁰

2.- CANNABINOIDES

Los extractos de *Cannabis sativa* (marihuana) se han utilizado por sus efectos calmantes y sedantes durante siglos.²¹ El consumo de marihuana causa relajación y le da a uno sensación de bienestar. El uso intensivo de marihuana también ha sido vinculado a la adicción, la ansiedad y los trastornos de pánico.²²

El género *Cannabis* pertenece a la familia Cannabaceae e incluye tres especies: *Cannabis sativa*, *indica* y *ruderalis*, las cuales presentan distintas propiedades psicoactivas. La planta *Cannabis sativa* contiene alrededor de 400 compuestos, de los cuales aproximadamente 80 son compuestos de terpeno-fenólicos activos denominados colectivamente como cannabinoides. La potencia de los cannabinoides depende principalmente de la especie y del proceso de extracción.²³

El sistema endocannabinoide es una señalización de lípidos. sistema en el cerebro que consiste en endocannabinoides, receptores cannabinoides y las enzimas involucradas en el biosíntesis o inactivación endocannabinoide.

Los endocannabinoides son derivados del ácido araquidónico, y los dos ligandos endógenos principales son anandamida (N araquidonoiletanolamina) y 2-araquidonoilglicerol. Hay dos tipos de receptores cannabinoides (CB1 y CB2), que pertenecen a la familia de las proteínas G acopladas receptores. Los endocannabinoides se sintetizan postsinápticamente de las moléculas precursoras de la membrana lipídica y actúan presinápticamente en los receptores CB1 modulando el arrendamiento de neurotransmisores en el sistema nervioso central. La señalización endocannabinoide ha sido implicada en la modulación del comportamiento de alimentación, dolor, procesos cognitivos²⁴ así como en la regulación de las respuestas conductuales al estrés.²⁵ El sistema endocannabinoide juega un papel importante en la patogénesis de los trastornos depresivos, que se sabe que está acompañado de funciones cognitivas deterioradas y ansiedad.²⁵

La investigación ha sugerido que la modulación de los 8 sistemas de señalización de cannabinoides endógenos neuronales podría representar un enfoque novedoso para el tratamiento de los trastornos relacionados con la ansiedad.²⁶

3.- WIN 55.212-2

Es un producto químico descrito como un derivado de aminoalquilindol, que produce efectos similares a los de los cannabinoides como el tetrahidrocannabinol (THC) pero tiene una estructura química completamente diferente. Es un potente agonista del receptor de cannabinoides que se ha encontrado que es un analgésico potente en un modelo de rata de dolor neuropático. Activa la quinasa MAP p42 y p44 a través de la señalización mediada por receptor. La evidencia experimental acumulada indica que uno de los compuestos cannabimiméticos sintéticos, WIN 55,212-2 (WIN) (un potente cannabinoide no selectivo CB1 y agonista del receptor CB2) potencia la actividad anticonvulsiva y ansiolítica de algunos fármacos antiepilépticos clásicos (es decir, diazepam, clonazepam carbamazepina, fenitoína, fenobarbital y valproato) y fármacos antiepilépticos de segunda generación (es decir, lamotrigina, pregabalina y topiramato) en el modelo de ataque tónico inducido por electrochoque (MES).²⁷

WIN 55,212-2 es un agonista completo en el receptor de cannabinoides CB1 ($K_i = 1.9$ nM) y tiene una afinidad mucho mayor que el THC ($K_i = 41$ nM) para este receptor.²⁸ WIN 55.212-2 también es un agonista de los receptores nucleares PPAR α y PPAR γ .²⁹ También reduce el funcionamiento voluntario de la rueda en ratones de laboratorio, pero con efectos que dependen tanto del origen genético como del sexo.³⁰

4.- MODELO PENTILENTETRAZOL (PTZ)

El pentilentetrazol (metrazol o α,β -ciclopentametilentetrazol, PTZ) se utiliza como agente convulsivante³¹ y es un antagonista no competitivo de los receptores GABA $_A$.³²

Es útil para la evaluación de nuevos fármacos en el tratamiento de convulsiones clónico-tónicas, las cuáles son muy similares a las que se presentan en humanos; la finalidad de este modelo es encontrar moléculas con actividades antagonistas al PTZ.³³

El patrón conductual consiste inicialmente en movimientos faciales, piloerección y cola erguida, seguida de espasmos musculares provenientes de la musculatura del cuello y tronco que se propagan a las extremidades (*mioclonus*), y posteriormente el animal pierde la postura y se desencadena la fase clónica que es característica por una serie de movimientos involuntarios bruscos seguidos de la crisis tónica que es una hiperextensión de las extremidades.^{34,35} Por lo que la administración de PTZ se considera un modelo idóneo para el estudio de crisis tónico-clónicas generalizadas; sin embargo, este modelo no permite diferenciar los fármacos efectivos en las crisis tónico-clónicas y las crisis de ausencia.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio tiene por objetivo evaluar la actividad anticonvulsiva de Fenobarbital y medir el nivel de protección proporcionado por WIN 55.212-2 al inducir crisis epilépticas mediante Pentilentetrazol, esperando un nivel favorable de protección favorable contra las crisis.

5.1.- Diseño de estudio

La administración se realizó vía intraperitoneal (IP) por tres días a cada grupo y dosis correspondiente con jeringas de insulina de 1 mL, siendo el Fenobarbital utilizado como reactivo estándar.

1) WIN

Se administró el cannabinoide sintético (WIN-55.212-2) a 5 mg/Kg

2) WIN + Fenobarbital

Se administró el cannabinoide sintético a 6 mg/Kg vía IP y Fenobarbital 35 mg/Kg vía oral.

3) Fenobarbital

Se administró un grupo de 8 ratones a una dosis de 75 mg/Kg de Fenobarbital.

*Las administraciones se llevaron a cabo por tres días y al tercero, la evaluación experimental del Modelo PTZ se realizó 30 minutos después de la administración.

5.2.- Animales

Ratones de la cepa CD1 macho de 25 a 30 g, se utilizaron como reactivo biológico y se colocaron en cajas de acrílico en grupos (mínimo 6 ratones) con agua y alimento a una temperatura controlada de 22° C con ciclo de luz/oscuridad de 12 h.

El modelo se realizó de acuerdo con los estándares éticos de investigación NOM-062ZOO-1999, aprobados por el Comité Nacional de Cuidados Animales y contenidos en la Ley General de la Salud. Los animales fueron proporcionados por el Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UPEAL). Número de protocolo 115, aprobado por el CICUAL-UAM-X (vigente).

5.3.- Análisis estadístico

Los datos se representan como la media \pm EEM de 8 repeticiones. Para el análisis se utilizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba de Tukey-Kramer. Un valor de $P < 0.05$ se consideró significativo.

6.- RESULTADOS

La evaluación del efecto neuroprotector de Fenobarbital y WIN en el modelo de epilepsia inducida por Pentilentetrazol (PTZ) en ratones CD1 arrojó lo siguiente:

Los resultados (figura 5) muestran que el WIN a una concentración de 5 mg/Kg disminuye de manera visible el número de crisis tónico-clónicas; por otro lado, la combinación del cannabinoide (6 mg/Kg) en combinación con Fenobarbital muestran un aumento de protección, ya que, a mayor dosis, la cantidad de crisis tónico-clónicas disminuye de manera favorable, pues aproximadamente el 75% de la población de dicho grupo presenta una cantidad de crisis menor o nula en comparación con el fármaco antiepiléptico, superando así, la efectividad que este proporciona por sí solo.

Oneway Analysis of Aparicion de crisis 3 X By Grupo

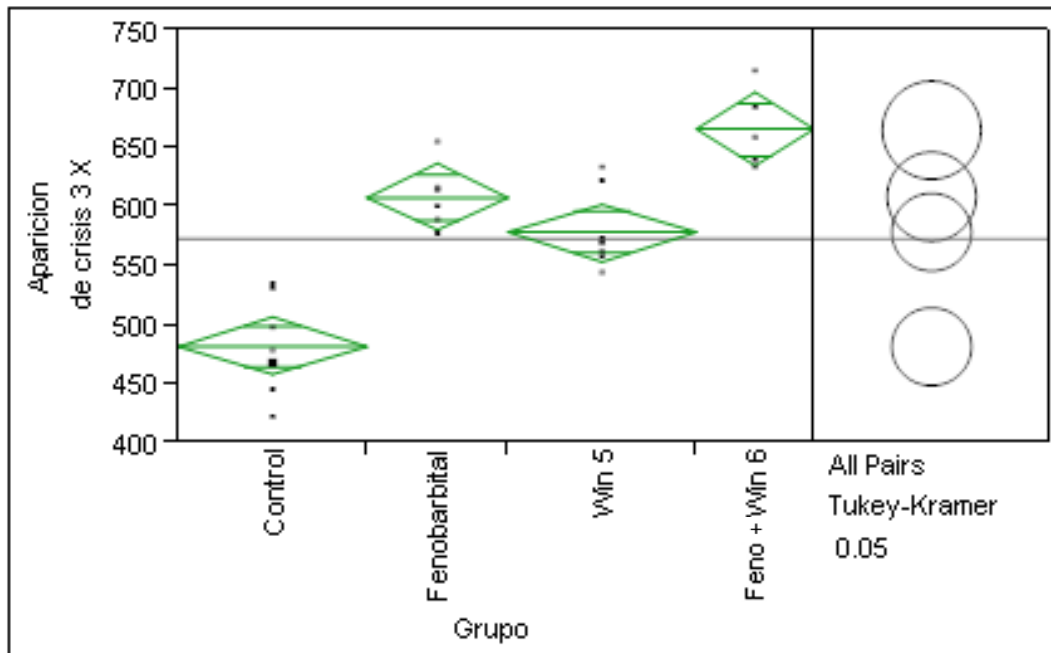


Figura 5. Muestra las diferencias significativas del grupo control vs. los fármacos empleados.

En la gráfica 5, se puede observar el nivel de protección proporcionado por los fármacos a sus diferentes concentraciones. Como se puede analizar, el efecto generado por la combinación de WIN y Fenobarbital presenta más eficacia que si se administran de manera individual, ya que la latencia de las crisis aumenta casi el doble a la del fármaco antiepiléptico, superando así, el efecto neuroprotector de Fenobarbital.

Además, se realizó un análisis ANOVA para comparar los cuatro grupos, el cual nos arrojó un valor $\text{Prof} > F < 0001^*$ (grupo WIN 6 mg/Kg + Fenobarbital), indicando que existe una diferencia estadísticamente significativa, con respecto a los otros tres grupos (figura 5).

Se llevó a cabo una transformación porque los modelos no se ajustaban a una transformación normal; una vez realizada esta transformación se añadió un análisis de residuales, el cual corresponde a una distribución normal, corroborando que el ANOVA está bien fundamentado.

7.- CONCLUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, aunque existen medicamentos con determinada eficacia contra alteraciones del SNC como la epilepsia, la búsqueda de nuevas alternativas a partir de productos naturales sigue siendo de interés para mantener dicha eficacia reduciendo los riesgos potenciales y efectos adversos. El estudio indica que el uso de WIN 55.212-2 ayuda de manera considerable disminuyendo la mortandad por epilepsia inducida. Se observa que a dosis más altas y en combinación con Fenobarbital, el periodo de latencia aumenta y por consecuencia también el número de muertes disminuye considerablemente, ya que, pre-sinápticamente, reduce la entrada de calcio en la neurona y con ello la exocitosis de neurotransmisores, mientras que de modo no sináptico reduce la conductancia a los iones Na^+ y K^+ , bloqueando las descargas repetidas además de que los efectos sedantes se hacen presentes. Lo anterior sugiere que, mediante inhibidores de la actividad neuronal, probablemente GABAérgica y/o serotoninérgica se vean involucradas por la inhibición observada en el efecto convulsivo del PTZ.

Sin embargo, aunque se observe un aumento en la eficacia antiepiléptica de Fenobarbital y WIN 55.212-2, esto no significa que lleven a cabo un efecto sinérgico, ya que para confirmar esto se deberían llevar a cabo otro tipo de estudios; lo que esto sugiere es que, al administrarse de manera simultánea, estos no compiten entre sí por los sitios activos.

A pesar de que los resultados obtenidos son favorables, no son contundentes, puesto que el aumento en el tiempo de presencia de crisis es sólo significativo de manera visual. Para que el resultado pueda ser considerado estadísticamente significativo se sugiere realizar el experimento con grupos que tengan un número de ratones más alto y un mayor número de concentraciones; por lo tanto, el presente estudio se propone como complemento o guía para futuras investigaciones más detalladas.

8.- REFERENCIAS

1. Forcadas-Berdusan MI. Epilepsia, esa desconocida. *Suma Neurológica*. 2003; 2 (1): 5-18.
2. Zavala-Tecuapetla, C, López-Meraz ML. Modelos experimentales de epilepsia en ratas en desarrollo. 2011; 2 (2): 3
3. Conn PN. Principios de farmacología. El manual moderno. México. Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Mc Graw-Hill. 10a. Edición. México, D.F. 2003.
4. Devinsky, O., Vezzani, A., O'Brien, T. *et al*. Epilepsy. *Nat Rev Dis Primers* 4. 18024.2018. doi:10.1038/nrdp.2018.24
5. Armijo J A. Fármacos Antiepilépticos y Anticonvulsivos. Florez J., Editor. *Farmacología Humana*. 3ª Edición. Barcelona, España; 1997. p. 479-501
6. Gil-Nagel A. Fármacos Anticonvulsivantes y Antiepilépticos, Velázquez Editor. *Farmacología Básica y Clínica* 18ª Edición. Barcelona, España. Editorial Médica Panamericana 2011. p. 243-259
7. Tratamiento Farmacológico de las Epilepsias Ed.: Elza Márcia Targas Yacubian, Guilca Contreras-Caicedo, Loreto Ríos-Pohl. Sao Paulo, Leitura Médica Ltda., Bela Vista – Sao Paulo, SP. 2014
8. Stahl S M. *Essential Psychopharmacology*. 3rd Ed. Cambridge University Press New York NY: 2008: 7-9
9. Brodie M J, 1, Zuberi S M, Scheffer I E, Fisher R S. The 2017 ILAE Classification of Seizure Types and the Epilepsies: What Do People with Epilepsy and Their Caregivers Need To Know?. 2018; 20(2):79-82.
10. Gram L, Dam M. *Epilepsy Explained*. Editorial médica Panamericana S.A. Marcelo T. de Alvear 2145. Buenos Aires, Argentina. 1995
11. Ortega V F. Tratamiento de la epilepsia. Ediciones Díaz de Santos. 1998 p. 113. ISBN 8479783257. Acceso: 23 de octubre de 2019.
12. Vaquero C J. *Patología quirúrgica del sistema nervioso*. Editorial Ramón Areces. 2006 p. 410. ISBN 8480047100. Acceso: 23 de octubre de 2019.
13. Orsatti, Luciano (2004). *Deporte para discapacitados mentales* (2.ª edición). Editorial Stadium S.R.L. p. 10. ISBN 9505312067. Acceso: 23 de octubre de 2019.

14. Kwan P, Brodie M J. Phenobarbital for the treatment of epilepsy in the 21st Century: a critical review. *Epilepsia*. 2004; 45: 1141–9. doi: 10.1111/j.0013-9580.2004.12704.
15. Ilangaratne N B, Mannakkara N N, Bell G S, and Sander J W. Phenobarbital: Missing In Action. 2012; 90 (12): 871–871A.
16. British Medical Association, Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, Royal College of Paediatrics and Child Health and Neonatal and Paediatric Pharmacists Group. «4.8.2 Drugs used in status epilepticus». *British National Formulary for Children*. 2006. p. 269
17. John M. Pellock, W. Edwin Dodson, Blaise F. D. Bourgeois. *Pediatric Epilepsy*. Demos Medical Publishing. 2001. p. 152
18. Varona J, Escribano E, Martín-Calderón J L. Fenobarbital: Farmacocinética, Toxicología y Monitorización por el Laboratorio. *Rev Diagn Biol*. 2001: 50 (1).
19. Ling-Li Z. Side effects of Phenobarbital In *Epilepsy: A Systematic Review*. *Epileptic Disord* 2011: 13 (4): 349-65
20. Hilal-Dandan R, Brunton L L. *Manual de Farmacología y Terapéutica*. Editorial McGraw-Hill. 2da Edición. 2015.
21. Zuardi A W. History of Cannabis as a Medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr*. 2006: 28 (2): 153-7
22. Keyhani S, Steigerwald S, Ishida J, Vali M, Cerdá M, Hasin D, Dollinger C, Yoo S R, Cohen B E. Risks and Benefits of Marijuana Use: A National Survey of U.S. Adults. *Ann Intern Med*. 2018: 169 (5): 282-290.
23. Benbadis S, Sanchez-Ramos J, Bozorg A, et al. Medical marijuana in neurology. *Expert Rev. Neurother*. 2014: 14 (12); 1453–65.
24. Zou S, Kumar U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci*. 2018: 19 (3): 833.
25. Gorzalka B B, Hill M N, Hillard C J. Regulation of Endocannabinoid Signaling by Stress: Implications for Stress-related Affective Disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008: 32 (6):1152-60.
26. Ibarra-Lecue I, Mollinedo-Gajate I, Meana J, Callado L, Diez-Alarcia R, Urigüen L. Chronic Cannabis Promotes Pro-hallucinogenic Signaling of 5-

- HT2A Receptors Through Akt/mTOR Pathway. *Neuropsychopharmacology*. 2018: 43. doi 10.1038/s41386-018-0076-y.
27. Florek-Luszczki M, Wlaz A, Kondrat-Wrobel M W, Tutka P, Luszczki J J. Effects of WIN 55,212-2 (a non-selective cannabinoid CB1 and CB2 receptor agonist) on the Protective Action of Various Classical Antiepileptic Drugs in the Mouse 6 Hz Psychomotor Seizure Model. *Journal of Neural Transmission*, 2014: 121 (7): 707
28. Kuster, J. E.; *et al.* "Aminoalkylindole Binding in Rat Cerebellum: Selective Displacement by Natural and Synthetic Cannabinoids". *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1993: 264 (3): 1352–1363.
29. O'Sullivan S E. "An update on PPAR activation by cannabinoids". *Br J Pharmacol*. 2016: 173 (12): 1899–910.
30. Keeney BK, *et al.* "Sex Differences in Cannabinoid Receptor-1 (CB1) Pharmacology in Mice Selectively Bred for High Voluntary Wheel-running Behavior". *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2012: 101 (4): 528–537.
31. Hildebrandt F. Pentamethylenetetrazole (Cardiazol). *Arch Exp Pathol Pharmacol* 1926: 116: 109–10.
32. Ammon-Treibe S, Grösch G. Pentylentetrazol-kindling in Mice Overexpressing Heat Shock Protein 70. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 2007: 375: 115-21.
33. Ramos-Morales F R, Correa-Basturdo J, Saavedra-Veléz M, Acosta-Hernández M E, Gasca-Pérez E, Pérez-Palacios A, Trujillo-Ferrara J. Modelo PTZ: un screening primario para el desarrollo de nuevas moléculas con actividad anticonvulsiónante. *Arch Neurocién*, 2012: 7 (1), 45-48.
34. Yonekawa W D. Relationship Between Pentylentetrazole-induced Seizures and Brain Pentylentetrazole Levels in Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1980: 214 (3): 589-593.
35. Kupferberg G., Schmutz M. Screening of New Compounds and the Role of the Pharmaceutical Industry. *Epilepsy: A comprehensive Textbook*. Engel, J. & Pedley T.A. (Eds) Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. 1997: 1417-34.