

26
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ESPECTRO DE ACCION ANTICONVULSIONANTE
DE LA 4-HIDROXI, 4-ETIL, 4-FENIL BUTIRAMIDA
(HEPB) Y SUS DOS HOMOLOGOS INFERIORES
(HEPP, HEPA).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ANA MARIA JAVIER GARCIA



Director de Tesis: Dra. Dalila Martínez de Muñoz

1990

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

AGRADECIMIENTOS

LISTA DE ABREVIATURAS

INDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCION

GENERALIDADES.....	1
1. FARMACO ANTIEPILEPTICOS.....	3
2. EVALUACION DE LA POTENCIA ANTICONVULSIONANTE (NIH).....	4
3. MODELOS DE EPILEPSIA EXPERIMENTAL.....	8
4. DISEÑO DE UN GRUPO DE COMPUESTOS ANTICONVULSIONANTES EN MEXICO..	12
5. HOMOLOGOS INFERIORES DE LA HEPB.....	13
6. NEUROTOXICIDAD DE LA HEPB Y SUS HOMOLOGOS.....	15
7. PROBABLE UTILIZACION TERAPEUTICA.....	16
8. DATOS ADICIONALES.....	18
OBJETIVO.....	20
APARATOS, SOLUCIONES Y REACTIVOS.....	21
METODOLOGIA	22
RESULTADOS	25
4-AMINOPIRIDINA	25
1. DETERMINACION DE LA DOSIS CONVULSIVA 97 (DC ₉₇)	25

II. DETERMINACION DEL INTERVALO OPTIMO DE PROTECCION QUE EJERCEN LA HEPB, LA HEPP Y LA HEPA CONTRA LA 4-AP.....	29
III. CURVAS DOSIS-RESPUESTA DE LA HEPB, LA HEPP Y LA HEPA CONTRA LA 4-AP	33
BICUCULINA.....	33
I. DETERMINACION DE LA DOSIS CONVULSIVA 97 (DC ₉₇).....	33
II. DETERMINACION DEL INTERVALO OPTIMO PARA OBTENER EL EFECTO DE MAXIMA PROTECCION DE LA HEPB, LA HEPP Y LA HEPA CONTRA BIC.....	37
III. CURVAS DOSIS-RESPUESTA DE LOS ANTICONVULSIONANTES CONTRA LA BIC.....	39
TIOSEMICARBAZIDA.....	41
I. DETERMINACION DE LA DOSIS CONVULSIVA 97 (DC ₉₇).....	41
II. CUANTIFICACION DEL INTERVALO ADECUADO DE ADMINISTRACION DE LOS ANTICONVULSIONANTES Y LA TSC PARA OBTENER EL EFECTO OPTIMO.....	45
III. CURVAS DOSIS-RESPUESTA DE LA HEPB, LA HEPP Y LA HEPA CONTRA LA TSC.....	47
ESTRICNINA.....	47

I. CALCULO DE LA DOSIS CONVULSIVA 97 (DC_{97}).....	47
II. DETERMINACION DEL TIEMPO OPTIMO DE LA HEPB, DE LA HEPP Y DE LA HEPA CONTRA LA EST.....	51
III. CURVAS DOSIS-RESPUESTA DE HEPB, HEPP Y HEPA CONTRA EST.....	55
PICROTOXINA.....	57
I. CALCULO DE LA DOSIS CONVULSIVA 97 (DC_{97}).....	57
II. TIEMPO OPTIMO PARA DETERMINAR EL MEJOR EFECTO AN_ TICONVULSIONANTE DE HEPA, HEPP Y HEPB CONTRA PIC.....	59
DISCUSION.....	63
1. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTICONVULSIONANTE.....	63
2. POTENCIA ANTICONVULSIONANTE: ANALISIS DE LAS DE_{50} s E ITs.....	63
3. ESPECTRO DE ACCION ANTICONVULSIONANTE DE LA HEPB Y SUS HOMOLOGOS, COMPARADO CON LA DE ALGUNOS FARMACOS ANTIEPILEPTICOS.....	67

4. INFLUENCIA DE LA CADENA CARBONADA	72
5. MECANISMO DE ACCION	74
CONCLUSIONES	76
PERSPECTIVAS	79
APENDICE	80
4-AMINOPIRIDINA	i
CURVAS DOSIS-RESPUESTA CONTRA 4-AP	ii
BICUCULINA.....	iii
CURVAS DOSIS-RESPUESTA CONTRA LA BIC.....	iv
TIOSEMICARBAZIDA	v
CURVAS DOSIS-RESPUESTA CONTRA LA TSC.....	vi
ESTRICNINA.....	vii
CURVAS DOSIS-RESPUESTA CONTRA LA EST.....	viii
PICROTOXINA	ix
HEPP CONTRA PIC.....	x
BIBLIOGRAFIA	81

L I S T A D E F I G U R A S Y T A B L A S .

F I G U R A S

NÚMERO	PAGINA	NOMBRE DE LA FIGURA.
1	9	Esquema de la sinápsis de GABA.
2	11	Esquema de la sinápsis de glicina.
3	14	Estructura y nombre de los compuestos anticonvulsionantes.
4	26	Curva dosis-respuesta de la 4-AP.
5	28	Cuantificación de los parámetros en la determinación de la DC_{97} .
6	30	Determinación del intervalo óptimo entre la administración de HEPB, HEPP y HEPA contra 4-AP para obtener el máximo efecto anticonvulsionante.
7	32	Curvas dosis-respuesta de HEPB, HEPP y HEPA contra 4-AP.
8	34	Determinación de la DC_{97} para BIC.
9	36	Cuantificación de los diferentes parámetros en la determinación de la DC_{97} de BIC.

FIGURAS

NUMERO	PAGINA	NOMBRE DE LA FIGURA.
10	38	Determinación del intervalo óptimo para obtener el efecto de máxima protección de la HEPB, la HEPP y la HEPA contra la BIC.
11	40	Curvas dosis-respuesta de HEPB, HEPP y HEPA contra BIC.
12	42	Determinación de la DC_{97} de TSC en ratones.
13	44	Cuantificación de los diferentes parámetros en la determinación de la DC_{97} de la TSC.
14	46	Cuantificación del intervalo óptimo de administración de los anticonvulsionantes y la TSC para obtener el mayor efecto protector.
15	48	Curvas dosis-respuesta de la HEPB, de la HEPP y de la HEPA contra la TSC.
16	50	Determinación de la DC_{97} de la EST en ratones.
17	52	Cuantificación de los diferentes parámetros en la determinación de la DC_{97} de la EST.
18	54	Determinación del tiempo de acción óptima de la HEPB, de HEPP y de la HEPA contra la EST.

F I G U R A S

NUMERO	PAGINA	NOMBRE DE LA FIGURA
19	56	Curvas dosis-respuesta de la HEPB y sus homólogos inferiores (HEPP y HEPA) contra la EST.
20	58	Determinación de la DC_{97} de la PIC en ratones.
21	60	Cuantificación de los parámetros en la determinación de la DC_{97} de la PIC.

T A B L A S

TABLA	PAGINA	TITULO DE LA TABLA.
I	7	Mecanismos de acción de algunos compuestos convulsionantes.
II	62	Análisis estadístico de las curvas dosis-respuesta de los anticonvulsionantes (HEPB, HEPP y HEPA) ante varios modelos de convulsiones.
III	64	Potencia anticonvulsionante de HEPB, HEPP y HEPA.
IV	68	Potencia de actividad anticonvulsionante de HEPB, HEPP y HEPA comparada con la de algunos fármacos antiepilépticos.

I N T R O D U C C I O N

Con el fin de efectuar una comparación de la actividad anticonvulsionante de los antiepilepticos sintetizados por Carvajal (8), se determinó el espectro de acción antiepileptica de la 4-hidroxi, 4-etil, 4-fenil butiramida (HEPB) y sus homólogos inferiores: 3-hidroxi, 3-etil, 3-fenil propionamida (HEPP) y la 2-hidroxi, 2-etil, 2-fenil acetamida (HEPA) los cuales se compararon contra una grupo seleccionado de compuestos convulsionantes, que se eligieron de acuerdo al proyecto de los NIH, como: 4-AP (ip), BIC (sc), TSC (ip), EST (ip) y PIC (sc).

Para ello se determinaron las DE_{50} de cada anticonvulsionante ante los diferentes convulsionantes obteniéndose los resultados siguientes: para HEPB, HEPP y HEPA ante 4-AP: 29, 19 y 24 $mgKg^{-1}$ respectivamente; contra BIC: 30, 38 y 29 $mgKg^{-1}$ en el mismo orden y ante TSC: 73, 43 y 47 $mgKg^{-1}$ análogamente.

En tanto que las DE_{50} de la HEPB y HEPA contra la EST fueron 106 y 56 $mgKg^{-1}$; ante PIC estos 2 compuestos no protegen con ninguna de las dosis administradas, sin embargo la HEPP protege limitadamente ante estos dos convulsionantes, contra EST bloquea solo 30% de las convulsiones y ante PIC solo protege a 37.5% de los animales.

Estos resultados muestran que la HEPP presenta un espectro de actividad anticonvulsionante similar y tan amplio como el de HEPA.

Lo sobresaliente es que HEPP presenta los mayores índices terapéuticos ante: 4-AP=11.26; BIC=5.63; TSC=4.97; que el de sus homólogos HEPA (4-AP=5.50; BIC=4.55; TSC=2.80; EST=2.36) y HEPB (4-AP=3.82; BIC=3.70; TSC=1.52; EST=1.04).

Por otro lado, la HEPP presentó un efecto de hiperactividad motriz marcada a partir de la dosis de 80 mgKg^{-1} , si se corrobora que este efecto antagoniza la hipoactividad producida por algún fármaco de uso común en el tratamiento de la epilepsia, este compuesto sería el ideal para proseguir estudios preclínicos.

Además en un estudio posterior se encontró que la DL_{50} de la HEPP es más alta que la de HEPB y la de HEPA, sin embargo una desventaja de HEPP es que su efecto anticonvulsionante dura poco tiempo ya que las curvas de intervalo de acción se revierten a los 60 min, lo que no ocurre con los otros homólogos.

Al comparar los compuestos de este estudio con fármacos antiepilépticos de uso clínico se observa claramente que la HEPB y sus homólogos tienen ventaja sobre esos compuestos en cuanto a DE_{50} s, ITs y espectro de acción anticonvulsionante.

Así que al tomar en cuenta todos estos parámetros como son: el poder anticonvulsionante, el espectro de acción anticonvulsionante y la toxicidad que presentan los 3 compuestos en estudio, el orden de elección para terminar los estudios preclínicos es: HEPP, HEPA y HEPB.

0

GENERALIDADES
DE
EPILEPSIA

Las epilepsias son afecciones crónicas de etiología diversa (9) caracterizadas por crisis recurrentes, debidas a una descarga excesiva de las neuronas cerebrales (crisis epilépticas) asociadas generalmente con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas. Debido a ello el tratamiento y manejo es diferente para cada tipo de epilepsia (30).

La clasificación de las epilepsias (33) es importante para establecer la terapia debido a que la tipificación apropiada de las crisis convulsivas es requisito indispensable para seleccionar el fármaco más apropiado.

Las principales causas que provocan epilepsias son: problemas en el embarazo y en el parto (infecciones, presión alta o mala atención obstétrica), infecciones tales como meningitis o encefalitis; algunas parasitosis (cisticercosis), traumas craneanos, ingestión de sustancias tóxicas (plomo, mercurio) y consumo de alimentos en mal estado, supresión de alcohol y de algunos medicamentos como barbitúricos; alteración metabólica o nutricional (desequi-

librio de agua y electrólitos). Y menos del 3% de los casos de epilepsia en niños las producen causas hereditarias.

El problema de la epilepsia en nuestro país ha alcanzado altas proporciones, se estima que entre 1% y 2% de la población mexicana padece algún tipo de epilepsia y que de este porcentaje el 75% se presenta en menores de edad. Aunque ésta se manifiesta en todas las edades 76.8% se exhibe antes de la adolescencia, 16.3% en el adulto joven, 5.2% en los adultos y el 1% en los ancianos.

En general, las crisis aparecen de manera ocasional o única, pero en algunos casos se suceden repetidamente, con frecuencia variable y con características clínicas que permiten fundamentar su diagnóstico.

Con el diagnóstico adecuado se logra controlar del 70 al 75% de los casos de epilepsia, en los restantes la persistencia de la crisis obedece a múltiples factores que se deben valorar individualmente (42). El tratamiento consiste en atacar la causa y eliminar las crisis con la administración selectiva de fármacos antiepilépticos. La efectividad de la terapia depende de la identificación temprana de la causa que produce crisis epilépticas, de su severidad, de la respuesta al tratamiento y de que este se sostenga el tiempo necesario para poder controlar las des-

cargas anormales.

FARMACOS ANTIEPILEPTICOS

Estos suprimen selectivamente las crisis epilépticas por aumento de la neurotransmisión inhibitoria o por disminución de la neurotransmisión excitatoria (35). En general al actuar de esta manera, estos compuestos causan trastornos en las funciones normales del cerebro y originan efectos centrales secundarios como: ataxia, sedación, falta de atención, somnolencia.

Los fármacos antiepilépticos que más se utilizan en la terapia son diez y pertenecen a los grupos siguientes, barbitúricos, hidantoínas, carbamazepinas, succinimidas, oxazolidindionas, benzodiazepinas y otros (valproato de sodio, clorometiazol).

Obviamente que para tantos tipos de epilepsia, los fármacos disponibles son insuficientes. Sin embargo, la investigación sobre antiepilépticos es limitada debido a su alto costo y a que pocas firmas farmacéuticas invierten en el desarrollo de estos compuestos. Es por eso que desde 1965 a 1975 solo se introdujeron 3 nuevos fármacos (21)

Este problema es vigente, puesto que con los antiepilepticos disponibles se controla el 75% de los casos clinicos y el resto constituye un serio problema medico.

Así, para promover la producción de nuevos fármacos antiepilepticos se creó el Proyecto de Cernimiento de Fármacos Antiepilepticos a cargo de los Institutos Nacionales de la Salud de E.U.A (NIH) (41). A 3 años de haberse iniciado el proyecto, 430 de 1780 compuestos probados, mostraron potencia antiepileptica en la primera fase de la evaluación. De estos, solo 14 tenían buenas perspectivas de desarrollo.

En México, esta problemática es mayor ya que existe dificultad para disponer de antiepilepticos para la terapéutica debido a la falta de continuidad en su producción como ha sucedido recientemente con el fenobarbital y la etosuccinimida.

EVALUACION DE LA POTENCIA ANTICONVULSIONANTE (NIH).

El programa de los NIH consta de 3 etapas sucesivas para determinar la potencia antiepileptica del compuesto en estudio.

La primera etapa, evalúa la existencia de la actividad anticonvulsionante, para ello se administran dosis de 30, 100 y 300 mgKg⁻¹ del antiepileptico al tiempo cero, para to-

dos los casos, posteriormente se inducen las convulsiones con ESM y PTZ respectivamente a los 30 min y 240 min después que el anticonvulsionante y se eliminan aquellos fármacos que no presentaron actividad anticonvulsionante (38).

En la segunda etapa, se cuantifica la actividad anticonvulsiva y la neurotoxicidad, así como la selectividad de acción anticonvulsionante. Aquí se utilizan dos modelos de epilepsia experimental: el electrochoque supramáximo (ESM) y el que se induce subcutáneamente con pentilentetrazol (PTZ). El ESM desencadena crisis convulsivas generalizadas y los fármacos que las contrarrestan en general son efectivos en el tratamiento de epilepsia generalizada (17).

La efectividad de los antiepilépticos contra PTZ, indica que estos podrían ser útiles en el tratamiento de las epilepsias generalizadas de tipo ausencia. En la prueba de ESM y en la de PTZ se determina la dosis efectiva media (DE_{50}). Para evaluar la neurotoxicidad del compuesto en estudio, se utiliza la prueba de Rotarod. Esta consiste en cuantificar la incoordinación motora en los animales, también sirve para detectar la neurotoxicidad mínima y así determinar la dosis tóxica media (DT_{50}).

En esta misma etapa, se determina la potencia anti-convulsionante y el índice terapéutico. Para ello, se seleccionan aquellos compuestos cuya dosis efectiva media (DE_{50}) fue menor de 100 mgKg^{-1} en los modelos mencionados anteriormente. Estos fármacos se prueban ante varios modelos de convulsionantes, para ello se utiliza una batería seleccionada de fármacos convulsionantes con diferente mecanismo de acción, entre ellos se tiene bicuculina, picrotoxina, estriquina, etc. (tabla I) (36). Para determinar el índice terapéutico ante estos modelos de convulsiones, se relaciona la dosis efectiva media con la dosis tóxica media calculada con la prueba de rotarod ($IT = DT_{50}/DE_{50}$).

Y la tercera etapa evalúa el potencial antiepiléptico en diferentes especies, además de determinar la dosis letal media (DL_{50}) y los efectos tóxicos que se puedan presentar en un período de administración oral de 7 a 14 días del compuesto en estudio.

Con la evaluación de estas 3 etapas, se selecciona el compuesto más potente y que presente las siguientes características: que sea efectivo contra ESM, PTZ o ante ambas pruebas y cuya dosis efectiva media sea menor de 100 mgKg^{-1} ; que la dosis tóxica media (DT_{50}) sea más del doble que la DE_{50} ; que presente un espectro de acción

T A B L A I

SISTEMA DE NEUROTRANSMISION	CONVULSIONANTES	MECANISMO DE ACCION	TIPO DE CONVULSIONES.
Inhibitorio: GABA	Bicuculina*	Antagonista de GABA. Compite por el receptor y disminuye la despolarización de aferentes primarios.	Mioclónicas constantes (crisis convulsivas generalizadas).
	Picrotoxina*	Igual al anterior.	Tónico-clónicas y crisis convulsivas generalizadas.
	Antagonistas del** fosfato de Piridoxal. Tiosemicarbasa, alilglicina, ác. α -mercaptopropiónico.	Inhiben la GAD y por tanto la síntesis de GABA. Forman complejos con el fosfato de Piridoxal (hidrazonas)	Convulsiones tónicas extensoras (tónico-clónicas generalizadas)
Glicina	Estricnina y brucina.	Antagonista de glicina. Compite por el receptor. Tienen efecto sobre el complejo BZ-GABA.	Tónico-clónicas con extensión de las extremidades, los animales mueren por paro cardíaco.
Excitatorio: Acetilcolina, catecolaminas, otros.	4-Aminopiridina.**	Aumenta la liberación de neurotransmisores. Bloquea canales de Ca^{++} y K^{+} .	Tónico-clónicas.
	Pentilentetrazol	Antagoniza GABA selectivamente, mediante inhibición postsináptica.	

* Datos obtenidos de Curtis, DR: et al, 1971; **Jenney, 1958; **Lundh, 1978 y Pasantes-Morales, 1981; Wu, 1974

+ Braestrup, 1980 y Curtis, 1971. El sitio de acción de los convulsionantes se indica en las fig. 1 y 2.

anticonvulsionante amplio o específico. Además, que no se presenten efectos tóxicos durante la administración oral de 7 a 14 días. El fármaco que manifieste estas características, será candidato para realizar con él los estudios clínicos posteriores y si pasa estos, finalmente será considerado como antiepiléptico.

MODELOS DE EPILEPSIA EXPERIMENTAL.

Estos modelos son útiles para estudiar los mecanismos que desencadenan crisis epilépticas, el probable mecanismo de acción de los compuestos anticonvulsivos y la evaluación de su potencia anticonvulsiva. Además, sirven para la determinación del espectro de acción anticonvulsiva de los anticonvulsivos y permite predecir su utilidad terapéutica en uno o más tipos de crisis epilépticas.

Los modelos de epilepsia más estudiados son de dos tipos: 1. De epilepsia generalizada y 2. de epilepsia parcial.

1. Con este tipo de modelo es posible inducir convulsiones tónico-clónicas semejantes a las crisis humanas generalizadas. Se induce con esti-

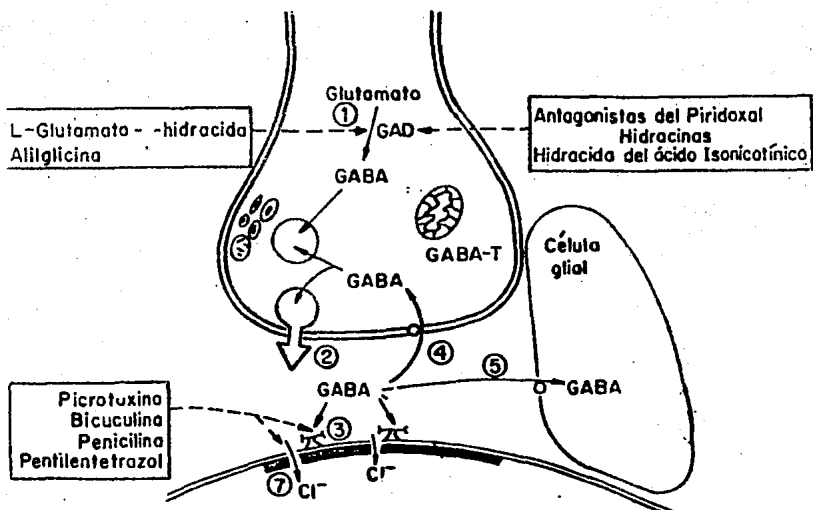


FIGURA 1: ESQUEMA DE LA SINAPSI GABAérgica EN SNC Y EFECTOS QUE EJERCEN ALGUNOS CONVULSIONANTES EN ESTE SISTEMA.

1. Síntesis enzimática;
2. Liberación de GABA de la neurona presináptica;
3. Interacción de GABA con su receptor postsináptico;
4. Captación de GABA por terminales presinápticas;
5. Captación de GABA por célula glial;
7. Canal de cloro-asociado con el receptor postsináptico.

Esquema tomado de Glaser & Kiffin, 1980

mulación eléctrica transcraneana (electrochoque) o con la administración sistémica de convulsionantes químicos tales como: pentilentetrazol, bicuculina, estriquina, tiosemicarbazida, 4-amino-piridina, picrotoxina y anestésicos locales como lignocafna, procafna o cocafna.

2. Con el método llamado Kindling se pueden inducir epilepsias parciales semejantes a la humana (44). El Kindling consiste en aplicar un estímulo eléctrico subumbral repetido en una zona restringida del SNC. También se producen crisis parciales por aplicación tópica de convulsionantes químicos como penicilina, estriquina, cobalto, crema de alúmina (16) o ácido tungstico. Una lesión por enfriamiento puede establecer igualmente un foco epiléptico cortical.

Por lo general estos estudios se realizan en mamíferos como: rata, ratón, conejo, gato, perro y mono, ya que en ellos es posible desarrollar crisis epilépticas por los métodos citados. Por la importancia que estos modelos tienen en la evaluación y la selección de fármacos anti-epilépticos, se resume el posible mecanismo de acción de los compuestos más utilizados y en especial de aquellos

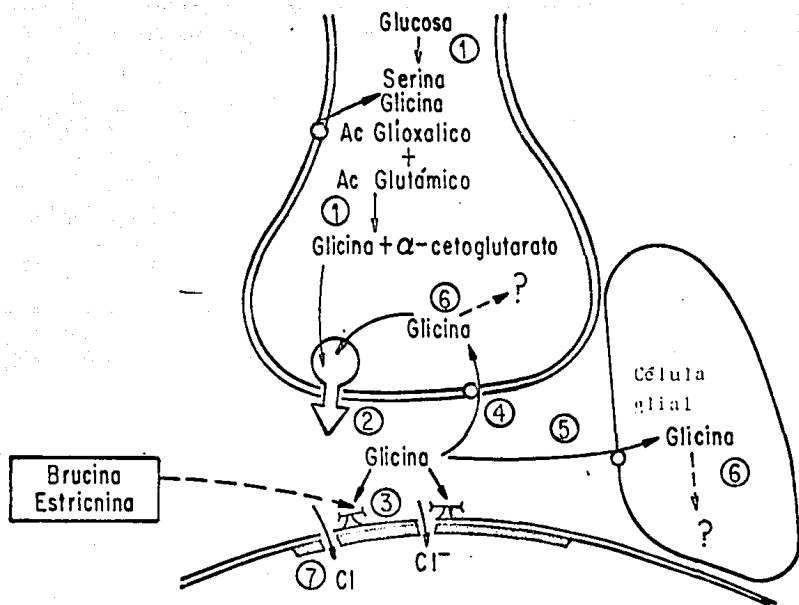


FIGURA 2: ESQUEMA DE LA SINAPSIS DE GLICINA EN MEDULA ESPINAL Y EFECTOS DE ALGUNOS CONVULSIONANTES EN ESTE SISTEMA.

1. Síntesis enzimática;
2. Liberación de la glicina de la neurona presináptica;
3. Interacción de glicina con su receptor postsináptico;
4. Captación por terminales presinápticas;
5. Captación por célula glial;
6. Catabolismo;
7. Canal de cloro-asociado con el receptor postsináptico.

Esquema tomado de Glaser & Kiffin, 1989.

que se emplean en esta tesis para la determinación del espectro de acción antiepiléptica de los fármacos en investigación (consultar la tabla I y las figuras 1 y 2).

DISEÑO DE UN GRUPO DE COMPUESTOS ANTICONVULSIONANTES EN MEXICO.

En 1964, el Dr. Carvajal diseñó y sintetizó 3 compuestos con capacidad anticonvulsionante (8), cuyas estructuras diferían de los antiepilépticos de uso común y se supuso que actuarían como inhibidores de la transaminasa del GABA (GABA-T). Estos elevarían los niveles de este neurotransmisor en el SNC, para eliminar las convulsiones (7).

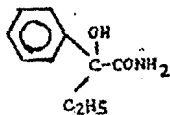
Los compuestos obtenidos primeramente fueron la 4-hidroxi, 4-metil, 4-fenil butiramida (HMPB), la 4-hidroxi, 4,4-difenil butiramida (HPPB) y la 4-hidroxi, 4-etil, 4-fenil butiramida (HEPB). Estos compuestos se evaluaron ante varios modelos de epilepsia experimental (7,8). De ellos, el que mayor efecto anticonvulsionante tuvo fue la HEPB, por lo que ha sido objeto de numerosos estudios subsecuentes (1, 2, 15, 25, 32, 37).

Además se observó que este compuesto tiene un efecto protector sobre la amnesia inducida con dosis convulsio-nantes de metrazol, en ratones, ante un reflejo de evi-tación pasiva (29), acción sobre la síntesis de proteí-nas y no altera el aprendizaje en ratas y en pichones (26), se demostró también una acción antihipertensiva en la hipertensión de origen central (10).

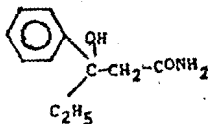
HOMOLOGOS INFERIORES DE LA HEPB.

En la búsqueda de nuevos homólogos con mayor efecti-vidad anticonvulsionante y menor toxicidad (6,46), se procedió a sintetizar 2 compuestos homólogos de la HEPB, pero de cadena carbonada más corta que corresponden a: 3-hidroxi, 3-etil, 3-fenil propionamida (HEPP) y a 2-hidroxi, 2-etil, 2-fenil acetamida (HEPA), los cuales se muestran en la figura 3.

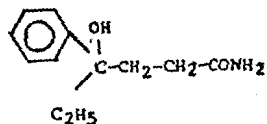
En la parte correspondiente a la segunda etapa del Programa de Evaluación de Fármacos Antiepilépticos de los NIII, efectuado previamente en este laboratorio (34) se encontró que este grupo de fármacos homólogos es efectivo contra las convulsiones inducidas con PTZ, pero poco po-tente para prevenir las convulsiones producidas con ESM.



2-Hidroxi, 2-etil,2-fenil
acetamida



3-hidroxi,3-etil,3-fenil
propionamida



4-hidroxi,4-etil,4-fenil
butiramida

FIGURA 3: Estructura y nombre químico de la HEPB y sus dos homologos inferiores, sintetizados por el Dr. Carvajal*.

* Comunicación del Dr. Carvajal, 1976.

NEUROTOXICIDAD DE LA HEPB Y SUS HOMOLOGOS.

En base a estudios preliminares (34) la DT_{50} del compuesto de cadena carbonada intermedia (HEPP) es casi el doble que la de sus homólogos HEPB y HEPA. Además en este laboratorio (11) se encontró que la DL_{50} de la HEPP es casi dos veces más elevada (858 mgKg^{-1}) que la que tienen sus homólogos: HEPB (473.8 mgKg^{-1}) y HEPA (473.8 mgKg^{-1}).

Aparte de estas variables, la HEPP tiene un efecto de hiperactividad motriz que se detectó al realizar la prueba de rotarod y cuya evaluación está en curso para determinar si este efecto es benéfico o no (11).

En general los antiepilépticos inducen depresión del SNC que se manifiesta por: estupor, somnolencia, hipoactividad motriz, etc. Estos efectos son indeseables pues merman la actividad motora del paciente epiléptico. Por lo tanto es conveniente determinar si la hiperactividad motora que induce la HEPP contrarresta el efecto depresor de ciertos antiepilépticos como Fenobarbital y Difenilhidantofna.

A reserva de caracterizar el efecto de hiperactividad motriz y debido a que la HEPP es la menos tóxica, este compuesto sería el seleccionado para que se prosigan los estudios de validación preclínica.

PROBABLE UTILIZACION TERAPEUTICA.

La epilepsia se clasifica en: parcial y generalizada, ésta a su vez se subdivide en epilepsia tipo ausencia, mioclónica y tónico-clónica.

En general se acepta que los fármacos que tienen una mayor respuesta contra ESM son eficaces en el tratamiento de la epilepsia tónico-clónica, tal es el caso de Difenhidantofna que es el fármaco de elección en este tipo de crisis. Este antiepiléptico es inefectivo contra PTZ y aunque posee un espectro de actividad anticonvulsionante amplio se considera específico. En tanto que los compuestos que bloquean efectivamente las convulsiones inducidas con PTZ se utilizan en el tratamiento de las epilepsias generalizadas tipo ausencia, como ocurre con Etosuccimida que es la primera opción en la terapéutica de este tipo de epilepsias, además de que posee un espectro de acción anticonvulsionante estrecho (27). Previamente Sánchez-Rodríguez (34) encontró que los 3 compuestos de este estudio, eran más efectivos contra PTZ que contra ESM lo que indicaba que podrían ser útiles en las epilepsias generalizadas tipo ausencia; en el mismo estudio también demostró que la HEPP presenta un efecto de hiperactividad motora. En esta tesis se determinó el espectro de actividad anticonvulsionante y se encontró que

estos tres compuestos aunque son más potentes que Valproato tienen un espectro de amplitud similar. Respecto al espectro anticonvulsionante que presenta Etosuccimida, los fármacos de esta investigación son mejores.

En consecuencia su probable utilización terapéutica sería:

- a) en la epilepsia generalizada tipo ausencia porque son efectivos ante PTZ.
- b) en varios tipos de epilepsia porque tienen un espectro tan amplio como el de Valproato y además son más potentes que este antiepiléptico.
- c) la HEPP podría administrarse en comedicación con antiepilépticos que producen depresión del SNC como Fenobarbital o Difenilhidantoína en las epilepsias tónico-clónicas.

La desventaja de Fenobarbital es que es un depresor del SNC cuyas consecuencias más evidentes en niños se manifiestan en el proceso memoria-aprendizaje. La ventaja principal de Valproato es su amplio espectro de actividad antiepiléptica probada en la terapia y su desventaja es que produce hepatotoxicidad, sobre todo cuando se coadministra con Fenobarbital (49). Por otro lado la Etosuccimida tiene un espectro de acción antiepiléptica más estrecho y su indicación antiepiléptica es específica.

DATOS ADICIONALES.

Pérez de la Mora (32) encontró que en ratones, la MEPP era inefectiva ante EST, además de que este anticonvulsivo facilitaba la presentación de convulsiones y en consecuencia sobrevenia más rápido la muerte. En el estudio presente no se comprobó ésta observación. Esta discrepancia se debe a diferencias metodológicas y a que en esta tesis el estudio fué más estricto y se determinó: la DE_{97} del convulsivo, el tiempo de acción óptima del anticonvulsivo y la DE_{50} de este compuesto lo que no se realizó en el trabajo mencionado (fig 17, 18, 19 y 20).

Meza (28) encontró que la MEPP era inefectiva ante TSC lo que discrepa de los resultados de esta tesis, esto se debe probablemente a que en tal estudio tampoco se administró el compuesto en el tiempo de acción óptima porque no se realizó una curva para determinarlo. Además no se realizaron curvas dosis-respuesta para establecer la DC_{97} ni la DE_{50} del anticonvulsivo lo que podría explicar las discrepancias.

Los datos de la literatura indican que las convulsiones inducidas con EST son muy enérgicas de tal manera que los animales que convulsionan mueren por paro cardíaco (36) lo

que afortunadamente no acontece al administrar la HEPP, que aunque no bloquea totalmente las convulsiones inducidas con EST logra proteger mejor contra la muerte a los animales que convulsionan (fig 19).

En base a estos hechos, lo que procedía era determinar el espectro de actividad anticonvulsionante de los 3 compuestos y compararlos con Valproato y Etosuccimida. Simultáneamente a esta tesis otros grupos de investigación realizan los estudios toxicológicos, teratológicos, fisiológicos y los efectos conductuales de la HEPP y sus homólogos, para decidir con cual de ellos se debe proseguir la investigación clínica correspondiente.

O B J E T I V O

Determinar el espectro de acción anticonvulsionante de la HEPB y sus dos homólogos inferiores (HEPP y HEPA), ante varios modelos de epilepsia experimental y con mecanismos de acción diferente. Y en base a su potencia anticonvulsionante predecir su utilidad en el tratamiento de las crisis epilépticas y decidir cual de los tres compuestos puede trascender esta etapa experimental.

APARATOS, SOLUCIONES Y REACTIVOS.

Reactivos:

El HCl fue adquirido de Baker. El polietilenglicol (PEG-400) se obtuvo de Fisher Scientific Co. La bicuculina, la estricnina, la 4-aminopiridina, la tiosemicarbazida y la picrotoxina se adquirieron de Sigma Chemicals Co.

La HEPB, la HEPP y la HEPA fueron sintetizadas por el grupo del Dr. Guillermo Carvajal de la ENCB - IPN.

Soluciones:

NaCl al 0.9% pH 7.4 y a pH 4.0; amortiguador de citrato-fosfato de sodio 0.15 M pH 4.0; Trisma-HCl 1 M pH 7.4.; HCl 0.025 N.

Aparatos:

Baño de ultrasonido, modelo B-220 (60-70 Hz) de Cole Palmer.

M E T O D O L O G I A

1. Se utilizan ratones macho de la cepa NMR-1 y peso de 30 \pm 2 g que se mantienen en condiciones controladas de temperatura y humedad y con agua y comida *ad libitum*.
2. En la primera parte de este proyecto, los sujetos experimentales se colocan en cajas de plexiglás y se observan individualmente por un periodo de tiempo determinado. Se evalúa el tiempo de latencia para la presentación de convulsiones, tipo de convulsiones y duración de las mismas, así se determina el número de animales que convulsionan y los que mueren por convulsión.
3. Los convulsionantes utilizados en éste estudio se disuelven en una solución salina amortiguada con Tris-HCl 15 mM pH 7.4 (excepto la BIC, que se solubiliza en HCl 0.025 N y el pH se ajusta a 4 adicionando amortiguador de citrato-fosfato 0.15 M pH 4.0). Los anticonvulsionantes (HEPB, HEPP y HEPA) se disuelven en una solución de PEG 400 al 10% en solución salina pH 7.4 con ayuda de un baño de ultrasonido y se admi-

nistran por vfa intraperitoneal (ip); los convulsionantes 4-aminopiridina, tiosemicarbazida y estriquina se administran intraperitonealmente, en tanto que la bicuculina y la picrotoxina se inyectan subcutáneamente.

4. Para encontrar la dosis convulsiva 97 de cada convulsionante se determina una curva dosis-respuesta para lo cual se prueban: 4-aminopiridina de 6 a 15 mgKg⁻¹; bicuculina de 2.9 a 3.4 mgKg⁻¹; picrotoxina de 4 a 7 mgKg⁻¹; tiosemicarbazida de 5 a 25 mgKg⁻¹ y estriquina de 0.5 a 2 mgKg⁻¹.
5. También se determina el intervalo óptimo para encontrar el mejor efecto anticonvulsionante de HEPB, HEPP y HEPA ante una batería seleccionada de fármacos convulsionantes. Para ello, se administra la dosis convulsiva 97 (DC₉₇) del convulsionante en estudio a los: 0, 10, 15, 20, 30 y 60 min. después de inyectar el anticonvulsionante a dosis de 80 mgKg⁻¹.
6. Finalmente la curva dosis-respuesta se realiza con la DC₉₇ del convulsionante correspondiente. Los compuestos HEPB, HEPP y HEPA se administran en el intervalo de acción óptima a dosis de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mgKg⁻¹. De los resultados obtenidos se determina la dosis efectiva media.

7. Para cada punto de las diferentes curvas se utilizan de 7 a 15 animales.
8. El análisis estadístico de todas las curvas dosis-respuesta y la comparación del paralelismo entre las mismas, así como el cálculo de la potencia relativa de cada anticonvulsionante se realiza de acuerdo al método de Lichfield & Wilcoxon (23).

R E S U L T A D O S

Con el propósito de determinar el espectro de acción anticonvulsiónante, los fármacos: HEPB, HEPP y HEPA, se evalúan ante una batería seleccionada de compuestos convulsiónantes con diferente mecanismo de acción. Para ello, se utilizan criterios ya establecidos (41) como son: la determinación del tiempo de latencia, el número de convulsiones tónicas por animal, la duración de los ataques convulsivos, el porcentaje de animales convulsiónados y la mortalidad de los mismos.

4- AMINOPIRIDINA

Determinación de la dosis convulsiva 97 (DC₉₇)

La gráfica de la figura 4 se obtiene de la curva dosis-respuesta, con la cual se determina la DC₉₇ de la 4-AP. La ecuación de la recta ajustada es:

$$y = 2.356 x - 0.681 \quad (R = 0.872)$$

donde: y = probit de ratones convulsiónados.

-x = logaritmo natural de la dosis de 4-AP.

R = coeficiente de correlación de la recta.

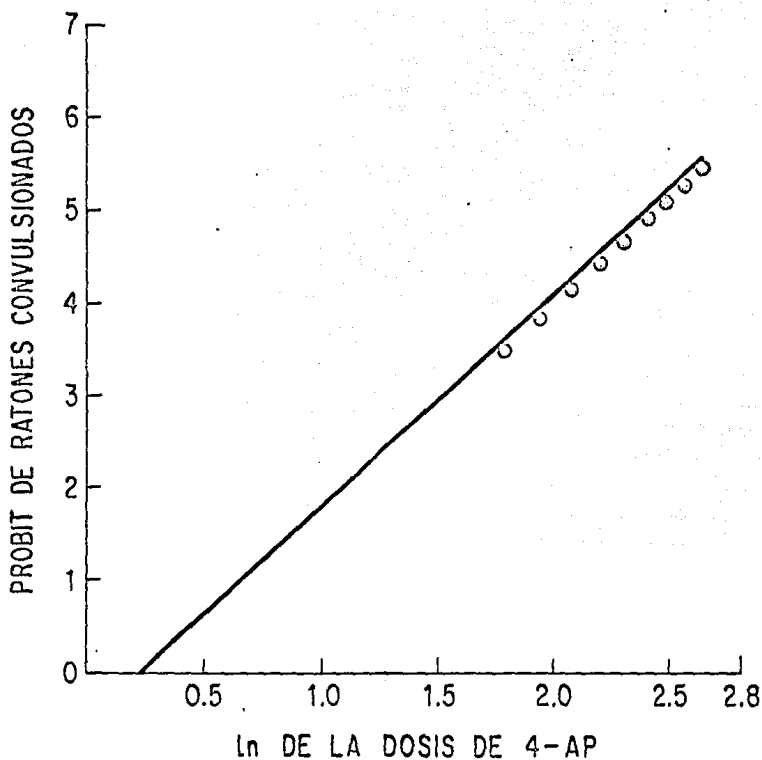


FIGURA 4 : DETERMINACION DE LA DC_{07} DE 4-AP EN RATONES.

Se administró 4-AP a ratones por vía ip, se evaluó el porcentaje de animales que presentaron convulsiones tónico-clónicas. Se probaron 9 dosis entre 6 y 15 mgkg^{-1} . La DC_{07} calculada fue 15 mgkg^{-1} (los datos originales se encuentran en la página i del apéndice).

El valor calculado para la DC_{50} fue de 11.14 mgKg^{-1} con límites fiduciales al 95% de confianza de 9.71 mgKg^{-1} (inferior) y 12.78 mgKg^{-1} (superior).

En el esquema 5 se aprecia la evaluación del cuadro convulsivo inducido por la 4-AP; en la parte A se nota un aumento del porcentaje de ratones muertos conforme se incrementa la dosis del convulsionante, la cual es inefectiva a dosis inferiores a 7 mgKg^{-1} .

En B, el porcentaje de ratones convulsionados se correlaciona con la dosis administrada de 4-AP y la forma de la curva es similar a la anterior (parte A). El promedio de convulsiones tónicas que presenta cada ratón es de 1.5 como se nota en la parte C.

En cuanto al período de latencia se advierte una relación inversa entre éste y la dosis de 4-AP, que a 14 mgKg^{-1} es de 522 seg (parte D). Así que para evaluar la protección que ejercen la HEPB, la HEPP y la HEPA contra las convulsiones inducidas con este compuesto y tomando en consideración las 4 variables anteriores, se administraron 15 mgKg^{-1} para producir convulsiones en el 97% de los animales en experimentación.

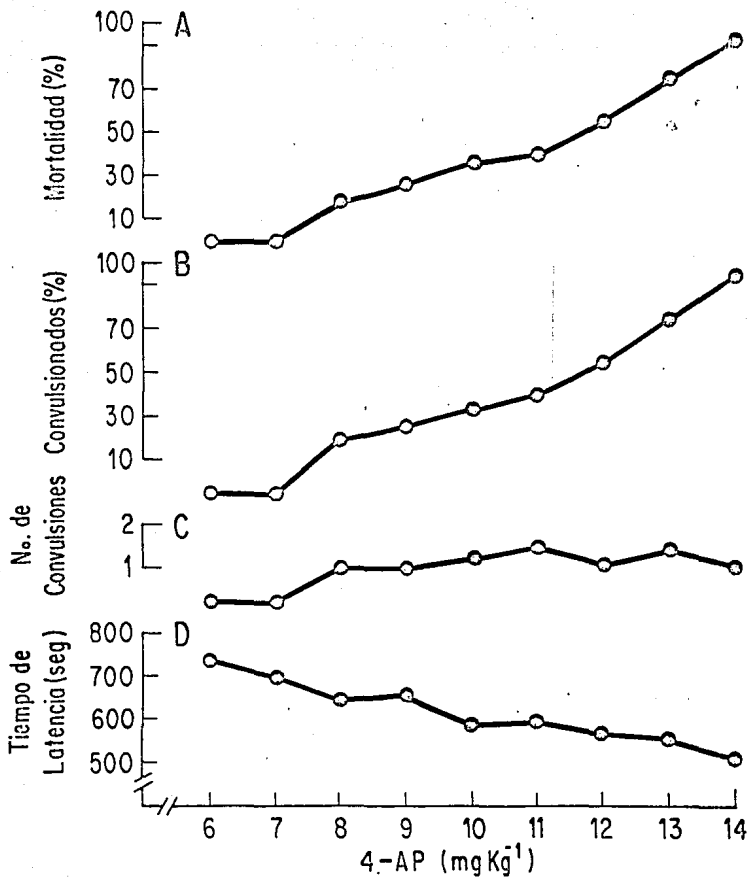


FIGURA 5 : CUANTIFICACION DE LOS DIFERENTES PARAMETROS EN LA DETERMINACION DE LA LD_{50} DE LA 4-AP.

Al administrar la 4-AP por vía i.v. a diferentes dosis se cuantifica el porcentaje de animales muertos y convulsionados, así también el número de convulsiones tónicas promedio por animal y la latencia promedio de las primeras convulsiones (ver explicación de la gráfica en la página 24).

Determinación del intervalo óptimo de protección que ejercen la HEPB, la HEPP y la HEPA contra la 4-AP.

Las curvas para determinar los intervalos de administración correspondientes a la HEPB, la HEPP y la HEPA contra la 4-AP se muestran en la figura 6.

En A, se muestra que la HEPB produce una disminución considerable en la presentación de muertes a 10 min. (80%) y en el intervalo de 20 a 30 hay una protección del 87% que persiste hasta los 60 min y el mayor bloqueo se obtiene a los 30 min. En lo referente a la HEPP, el porcentaje de mortalidad se reduce a los 10 min, el cual se revierte a los 30 min y se mantiene hasta los 60 min donde se tiene un 46% de mortalidad. En cuanto a HEPA, se observa un gran descenso del porcentaje de muerte en el intervalo de 15 a 60 min y la mayor efectividad también se logra a los 30.

Si se analiza el porcentaje de animales que convulsionan (parte B) la HEPB los protege adecuadamente en el intervalo de 20 a 30 min, ya que bloquea un 88% de las convulsiones, este efecto se revierte y a los 60 min solo se tiene un 72% de protección. La curva de inhibición óptima contra la presentación de convulsiones de la

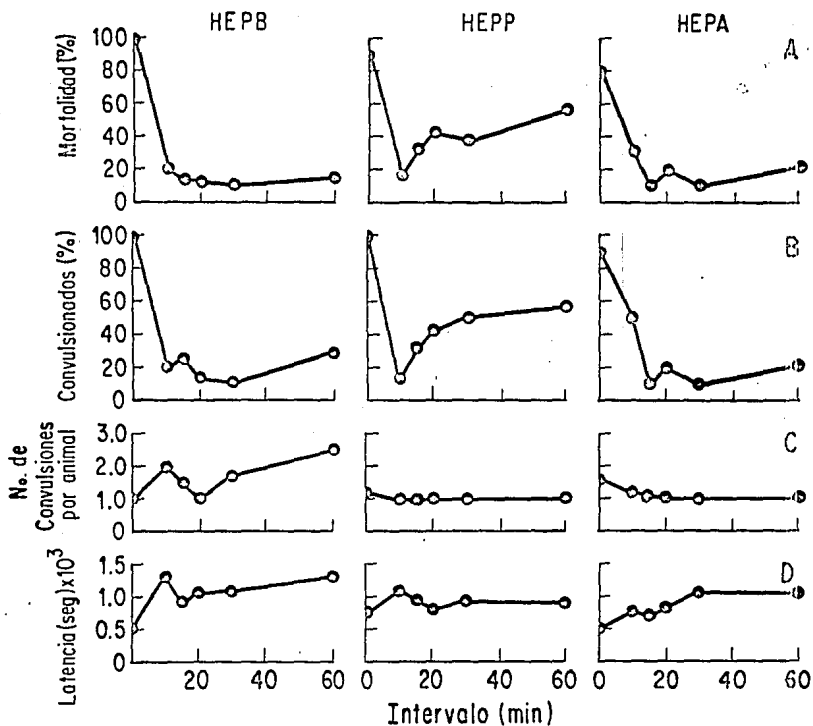


FIGURA 6 : DETERMINACION DEL INTERVALO DE TIEMPO OPTIMO ENTRE LA ADMINISTRACION DE HEPB, HEPP Y HEPA CONTRA 4-AP PARA OBTENER EL MAXIMO EFECTO ANTICONVULSIONANTE.

Los antiepilepticos se administraron por vfa ip (80mgKg^{-1}) a diferentes tiempos antes de inducir las convulsiones con 4-AP (15mgKg^{-1}), se evaluó el porcentaje de animales muertos y convulsionados, también el número de convulsiones tónicas por animal y la latencia promedio en la presentación de la primera convulsión. (ver explicación de la gráfica en la pág. 26.)

HEPP, se comporta de manera similar a la de mortalidad en el intervalo de 10 a 60 min y su mayor efecto contra los ataques convulsivos lo ejerce a los 10 min (82%). La HEPA produce su mejor efecto contra las convulsiones a los 20 y 30 min donde solo las manifiestan el 10% de los animales, esta curva también coincide con la de la parte A.

La HEPB no modifica significativamente el promedio de convulsiones tónicas por animal que es de 2 (parte C). La HEPP, también las mantiene constantes (1) en todos los tiempos estudiados. En los primeros 15 min la HEPA conserva casi invariable el número de convulsiones (1.3-1.0), las que se mantiene hasta los 60 min (1.0).

En cuanto el período de latencia que se cuantifica en D, la HEPB lo incrementa paulatinamente en el intervalo de 10 a 60 min, pero el mayor retraso del cuadro convulsivo se ejerce a los 10 min (1340 seg). La HEPP también lo aumenta en el intervalo de 10 a 30 min, pero sobre todo a los 10 min (1300 seg.). En lo que respecta a la HEPA la latencia de los ataques convulsivos se incrementa considerablemente de 10 a 30 min y persiste aún a 60 (1000 seg).

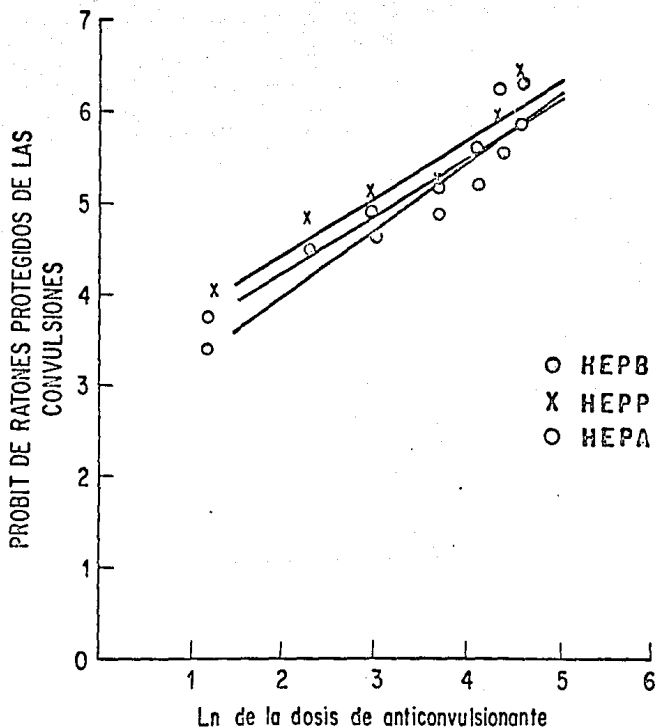


FIGURA 7: CURVAS DOSIS-RESPUESTA DE HEPB, HEPP Y HEPA CONTRA 4-AP

Los anticonvulsivantes se administraron por vía i.p. a los 30, 10 y 30 min respectivamente antes que la 4-AP (i.v). Se evaluó el porcentaje de animales convulsionados. Se probaron 5 dosis entre 10 y 100 mg/kg⁻¹. Las DE₅₀ fueron 29.7, 18.9 y 23.5 mg/kg⁻¹ respectivamente (los datos originales se muestran en la página iv del anéndice).

En consecuencia, al tomar en cuenta los 4 parámetros se concluye que los intervalos óptimos de administración entre la HEPB, la HEPP y la HEPA contra la 4-AP son: 30, 10 y 30 min respectivamente.

Curvas dosis-respuesta de la HEPB, la HEPP y la HEPA contra la 4-AP.

Para la determinación de la dosis efectiva media (DE_{50}) de los anticonvulsionantes se realizaron las curvas dosis-respuesta que se muestran en la figura 7, las cuales fueron determinadas en el rango de 10 a 100 $mgKg^{-1}$.

Las ecuaciones de las rectas ajustadas, las dosis efectivas medias (DE_{50}) con sus límites fiduciales al 95% de confianza se muestran en la tabla III.

BICUCULINA.

Determinación de la dosis convulsiva 97 (DC_{97})

De manera similar a la descrita para la 4-AP, se determina para la BIC la DC_{97} , cuya curva se muestra en la figura 8. La ecuación de la recta ajustada es:

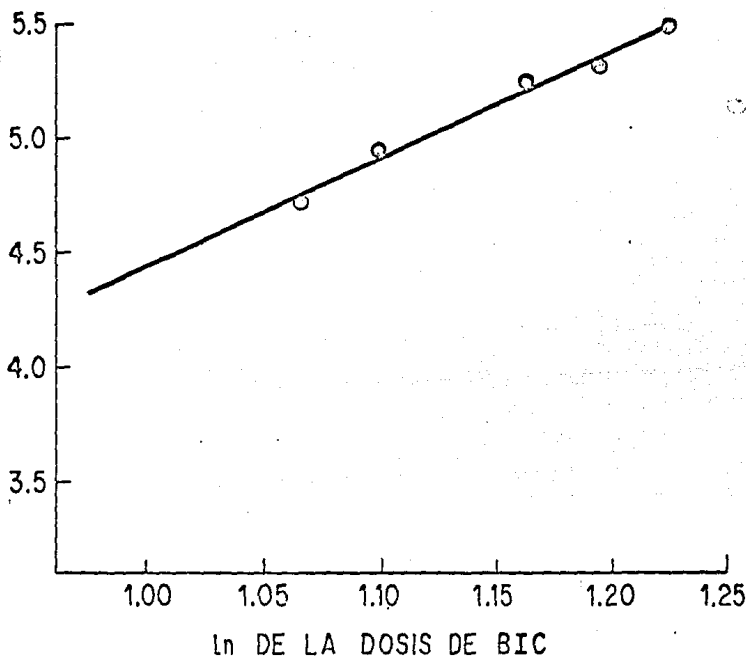


FIGURA 8 : DETERMINACION DE LA DC_{97} PARA BIC.

Se administró el convulsionante por vía sc en ratones, se evaluó el porcentaje de animales que presentaron convulsiones tónico-clónicas. Se probaron 5 dosis entre 2.9 y 3.4 $mgKg^{-1}$.

La DC_{97} experimental fué de 3.3 $mgKg^{-1}$ (los datos originales se encuentran en la página iii del apéndice).

$$y = 4.622 x - 0.157 \quad (R = 0.963)$$

donde: y = probit de ratones convulsionados.

x = logaritmo natural de la dosis de BIC.

R = coeficiente de correlación de la recta.

La dosis convulsiva media (DC_{50}) obtenida fué de 3.05 mgKg^{-1} con límites fiduciales al 95% de confianza de 2.78 mgKg^{-1} (inferior) y 3.35 mgKg^{-1} (superior).

La evaluación de la curva dosis-respuesta para obtener la DC_{97} de la BIC se muestra en la figura 9. Se nota que la mortalidad que se evalúa en A, se correlaciona con la dosis administrada de BIC (2.9 a 3.4 mgKg^{-1}). En B, la curva de convulsionados sigue un comportamiento similar a la de A y este compuesto es ineficaz a dosis menores a 2.9 mgKg^{-1} .

El número de convulsiones por animal es constante (1), porque los animales mueren después de éstas, como se aprecia en C. El tiempo de latencia mantiene una relación inversa a la dosis administrada de BIC y que a 3.4 mgKg^{-1} es de 300 seg como se verifica en D. Por tanto, al tomar en consideración los 4 parámetros determinados, se elige la dosis de 3.4 mgKg^{-1} con la que el 97% de los animales tratados convulsionan

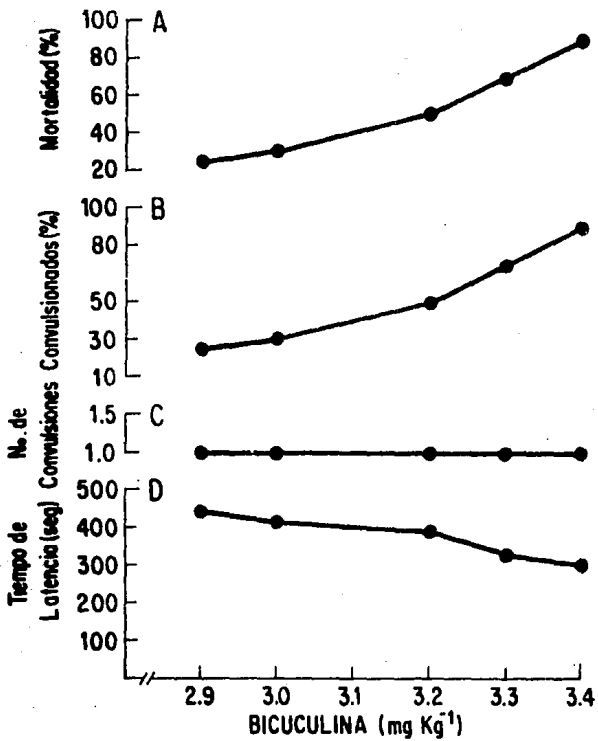


FIGURA 9 : CUANTIFICACION DE LOS DIFERENTES PARAMETROS EN LA DETERMINACION DE LA DC₉₇ DE BIC.

Se administró la BIC por vía sc a diferentes dosis, se cuantificó el porcentaje de animales muertos por convulsión y el de convulsionados, así mismo el número de convulsiones tónicas por animal y la latencia promedio en la presentación de la primera convulsión (ver explicación en la pág. 32).

Determinación del intervalo óptimo para obtener el efecto de máxima protección de la HEPB, la HEPP y la HEPA contra BIC.

Para obtener el intervalo en el cual el efecto anti-convulsivo es óptimo, se administran 80 mgKg^{-1} del anti-convulsionante y la DC_{97} de BIC a los tiempos indicados en la figura 10.

En la evaluación de la mortalidad que se presenta en A, la HEPB ejerce una clara protección en el intervalo de 10 a 60 min y el efecto óptimo se logra a los 30 min (70%).

La HEPP inhibe la mortalidad (60%) en el rango de 10 a 15 min, pero de 20 a 60 min. este efecto tiende a revertirse y a 60 min es del 10%. En tanto la protección que proporciona la HEPA contra la muerte por convulsión es del 60% entre 15 - 30 min y este efecto disminuye a los 60 min (35%).

En la parte B de la gráfica, se cuantifica el porcentaje de animales que convulsionan con respecto al intervalo de tiempo de administración, la curva de la HEPB en esta evaluación coincide aceptablemente con la de mortalidad y la máxima protección la ejerce a los 30 min

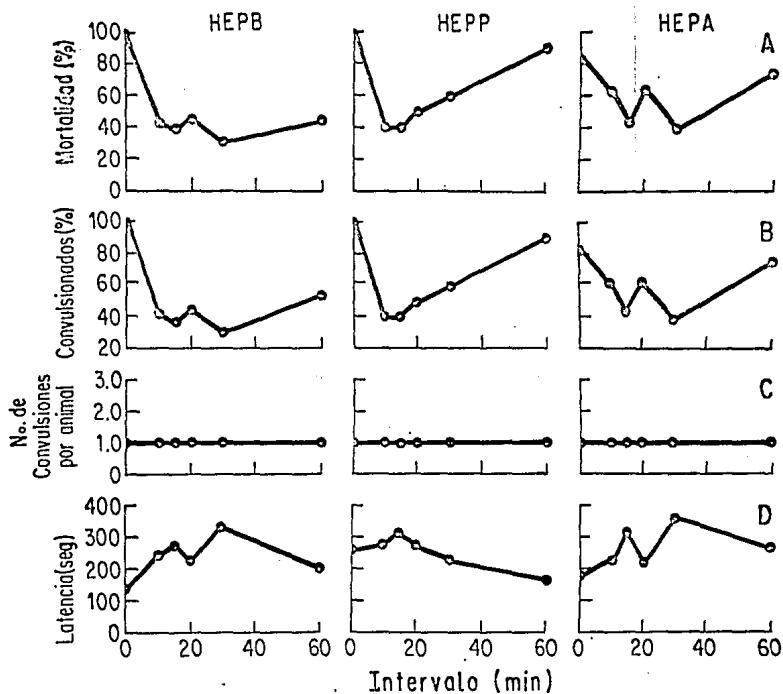


FIGURA 10: DETERMINACION DEL INTERVALO OPTIMO PARA OBTENER EL EFECTO DE MAXIMA PROTECCION DE LA HEPB, LA HEPP Y LA HEPA CONTRA LA BIC.

La HEPB y sus homólogos se administraron por vía in (80mgkg⁻¹) a diferentes tiempos antes de tratar con BIC (3.4 mg.kg⁻¹).

Se evaluó el porcentaje de ratones muertos y convulsionados, también el núm. de convulsiones por animal y la latencia promedio de la aparición de la primera convulsión (ver explicación de la gráfica en la página 34).

Lo mismo sucede con la HEPP, pero el mayor efecto se encuentra entre 10 a 15 min (60%). La curva de convulsiones de la HEPA también guarda similitud con la de mortalidad, pero el efecto protector máximo se observa de 15 a 30 min.

El promedio de convulsiones por ratón se mantiene constante (1) en todo el intervalo de tiempo para los 3 anticonvulsivos como se muestra en la parte C. Sin embargo, en la latencia de aparición del cuadro convulsivo, la HEPB produce un incremento entre 10 a 30 min, el que disminuye a los 60 min. En cuanto a la HEPP, su período de retardo guarda una proporción inversa con el tiempo entre 20 a 60 min, donde el mayor retraso se ve a los 15 min (287 seg). Tomando como base los 4 parámetros cuantificados se demuestra que los tiempos óptimos de administración entre los anticonvulsivos (HEPB, HEPP y HEPA) y la BIC para obtener el efecto de mayor protección son: 30, 10 y 30 min respectivamente.

Curvas dosis-respuesta de los anticonvulsivos contra la BIC.

Con los datos de las curvas dosis-respuesta de la HEPB, HEPP y HEPA se realizaron las curvas de la figura

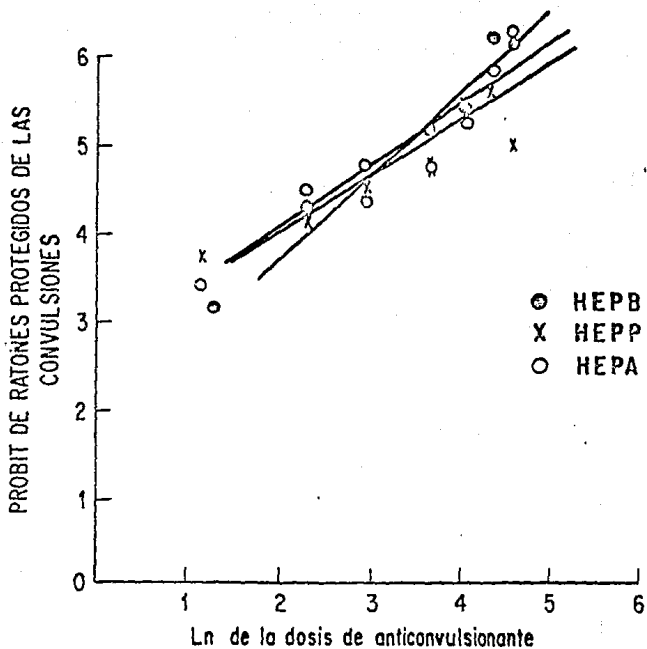


FIGURA 11: CURVAS DOSIS-RESPUESTA DE HEPB, HEPP Y HEPA CONTRA BIC.

Estos anticonvulsivos se administraron por vía ip a los 30, 10 y 30 min para HEPB, HEPP y HEPA respectivamente antes que la BIC (sc). Se evaluaron los animales convulsionados. Se probaron 6 dosis entre 10 y 100 mgKg^{-1} . Las DE_{50} fueron: 29.7, 37.9 y 28.8 mgKg^{-1} en el mismo orden (los datos originales se muestran en la página iv del apéndice).

1.1 con las que se determinaron las DE_{50} . Los anticonvulsivos se administraron en dosis de 10 a 100 $mgKg^{-1}$.

Las dosis efectivas medias (DE_{50}) con sus límites de confianza al 95%, así como las ecuaciones de la recta ajustadas se encuentran en la tabla III.

TIOSEMICARBAZIDA

Determinación de la dosis convulsiva 97 (DC_{97}).

En la gráfica que se muestra en la figura 12 se determina la DC_{97} de la TSC. La ecuación de la recta ajustada es:

$$y = 2.656 x - 1.466 \quad (R = 0.942)$$

donde: y = probit de ratones convulsionados.

x = logaritmo natural de la dosis de TSC.

R = coeficiente de correlación de la recta.

La dosis convulsiva media (DC_{50}), que se obtuvo fue de 11.41 $mgKg^{-1}$ con límites fiduciales al 95% de confianza de 9.94 $mgKg^{-1}$ (inferior) y 14.41 $mgKg^{-1}$ (superior).

El estudio de la curva de la cual se determina la DC_{97} se encuentra en la figura 13; la parte A, muestra que

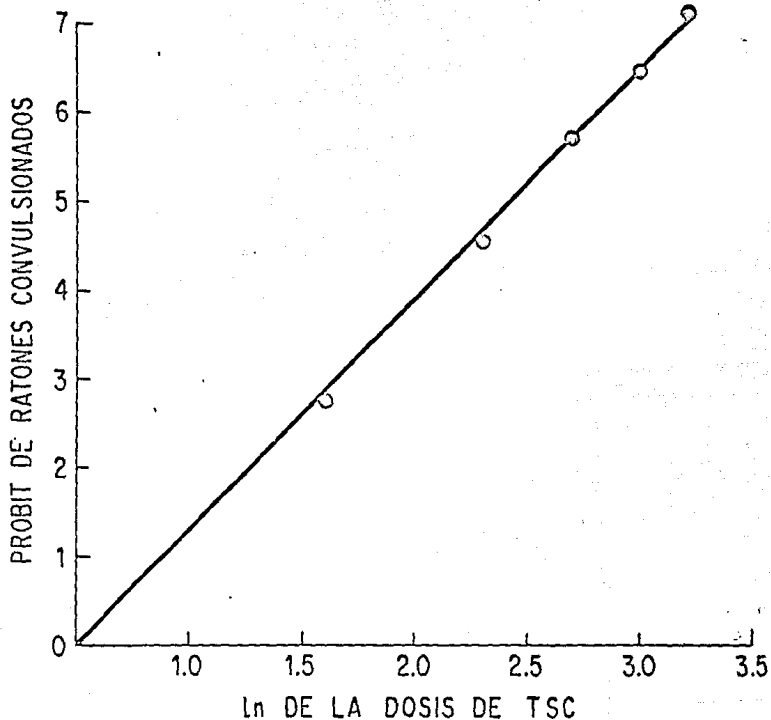


FIGURA 12: DETERMINACION DE LA DC_{97} DE TSC EN RATONES.

Se administró la TSC a ratones por vía *ip*, se determinó el porcentaje de animales que presentaron convulsiones tónico-clónicas. Se probaron 5 dosis entre 5 y 25 $mgKg^{-1}$. La DC_{97} experimental fue de 20 $mgKg^{-1}$ (los datos originales se encuentran en la página V del apéndice).

el porcentaje de muerte aumenta en relación a la dosis y el mayor efecto se tiene a 25 mgKg^{-1} . La curva de presentación de convulsiones tiene un comportamiento similar a la de mortalidad donde la máxima respuesta se encuentra a 25 mgKg^{-1} y se nota que a dosis menores de 5 mgKg^{-1} , este compuesto es inefectivo (B). El número de convulsiones tónicas por animal en las dosis de 15 a 25 mgKg^{-1} son de 0.5 a 2 como se anota en C. En tanto que al analizar el tiempo de latencia se encuentra que hay una relación inversa entre éste y la dosis administrada y que a 25 mgKg^{-1} presenta una latencia de 3000 seg. (D).

Por lo anteriormente expuesto y al analizar las 4 variables, se considera conveniente utilizar la dosis de 20 mgKg^{-1} , que produce convulsiones en 97% de los animales de experimentación y con ella evaluar la acción anticonvulsionante que ejercen la HEPB, la HEPP y la HEPA contra este compuesto.

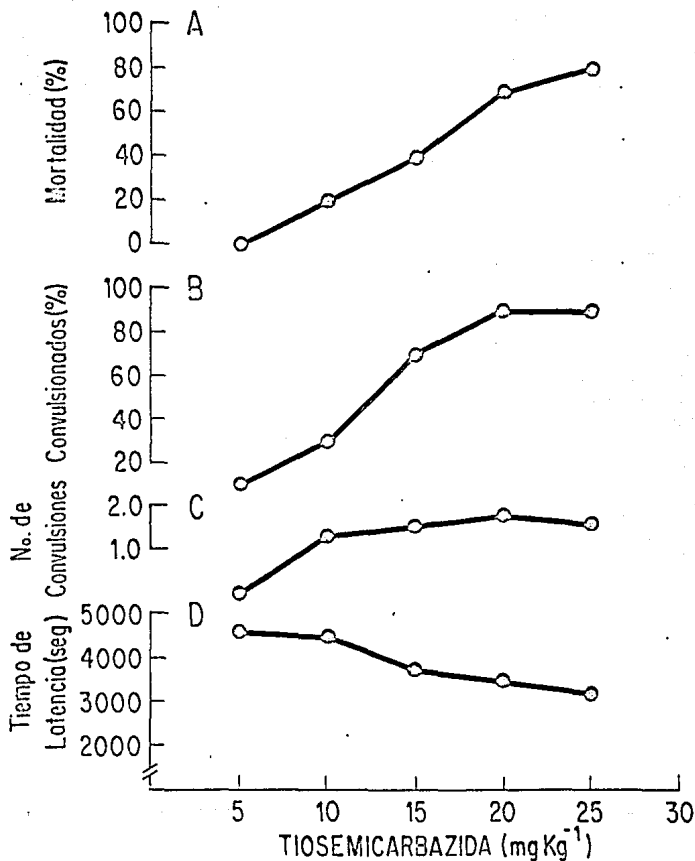


FIGURA 13: CUANTIFICACION DE LOS DIFERENTES PARAMETROS EN LA DETERMINACION DE LA DC_{97} DE LA TSC.

La TSC se administra por vía *in* a dosis variables y se determina el porcentaje de animales que mueren por convulsión, y el de convulsionados, el número de convulsiones por animal y el tiempo promedio de latencia en el cual se presentan las primeras convulsiones (ver explicación en la página 40).

Cuantificación del intervalo adecuado de administración de los anticonvulsionantes y la TSC para obtener el efecto óptimo.

La determinación del tiempo al cual se tiene el mejor efecto protector de la HEPB, la HEPP y la HEPA contra la TSC, se puede observar en la figura 14.

En la parte A, se muestra que la HEPB disminuye el porcentaje de mortalidad hasta un 80% a los 30 min y que se mantiene hasta los 60 min, pero en el intervalo de 10 a 15 min. la protección es 56%.

En lo referente a la HEPP, la mayor protección contra la mortalidad se observa a los 10 min (60%), la cual se revierte a los 60 min. (30%). En cuanto a la HEPA, produce una inhibición del 80% en la mortalidad a los 10 min. la que se revierte a partir de 20 min. y a 60 es del 50%.

El porcentaje de animales convulsionados se observa en B. La HEPB los protege en el intervalo de 10 a 60 min, pero el máximo efecto se ejerce de 15 a 30 min. (40%). En tanto la HEPP, mantiene el efecto protector casi invariable en el intervalo de 10 a 60 min y la mayor protección se determina entre 10 a 15 min (30%). En lo referente a HEPA, el efecto protector disminuye en el intervalo de

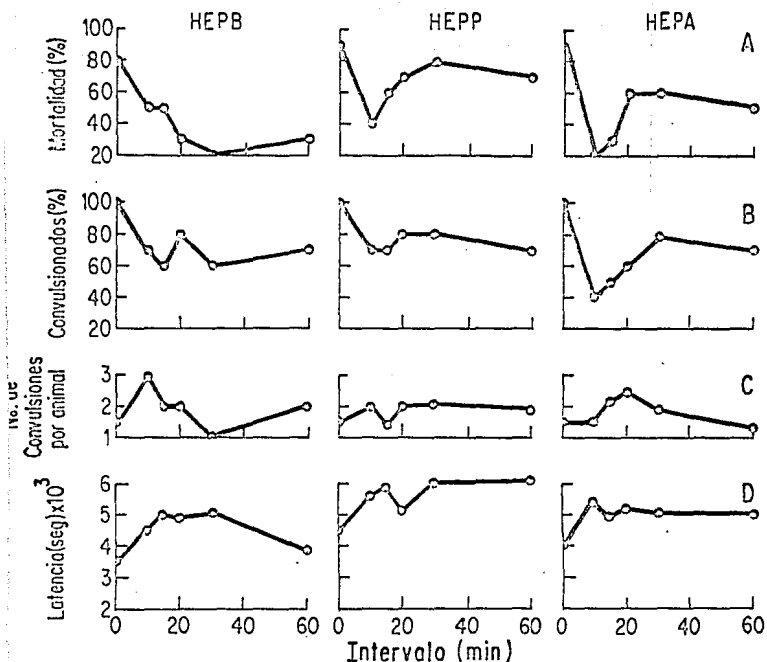


FIGURA 14 : CUANTIFICACION DEL INTERVALO OPTIMO DE ADMINISTRACION DE LOS ANTICONVULSIONANTES Y LA TSC PARA OBTENER EL MAYOR EFECTO PROTECTOR.

La HEPB, la HEPP y la HEPA se administraron por vfa ip (80 mg kg^{-1}) a tiempos variables antes de inducir las convulsiones con TSC por vfa iv (20 mg kg^{-1}), se cuantifica el porcentaje de animales muertos y convulsionados, el núm de convulsiones promedio por animal y el tiempo en que aparece la primera convulsión (ver la explicación de la gráfica en la página 42).

Curva dosis-respuesta de la HEPB, la HEPP y la HEPA contra la TSC.

La figura 15 representa las gráficas con las cuales se obtiene la dosis efectiva media de la HEPB, la HEPP y la HEPA contra la TSC, a dosis de 10 a 100 mgKg⁻¹ de cada anticonvulsionante. El valor obtenido para la DE₅₀, las ecuaciones de las rectas ajustadas y los límites fiduciales al 95% se encuentran en la tabla II.

ESTRICNINA

Cálculo de la dosis convulsiva 97 (DC₉₇)

Para cuantificar la DC₉₇ de la estricnina los datos se grafican como lo muestra la figura 16. La ecuación de la recta ajustada es:

$$y = 3.11 x + 4.44 \quad (R = 0.856)$$

donde: y = probit de ratones convulsionados.

x = logaritmo natural de la dosis de EST.

R = coeficiente de correlación de la recta.

Las gráficas de la figura 17 con las cuales se determina la DC₉₇ de la EST se analizan a continuación.

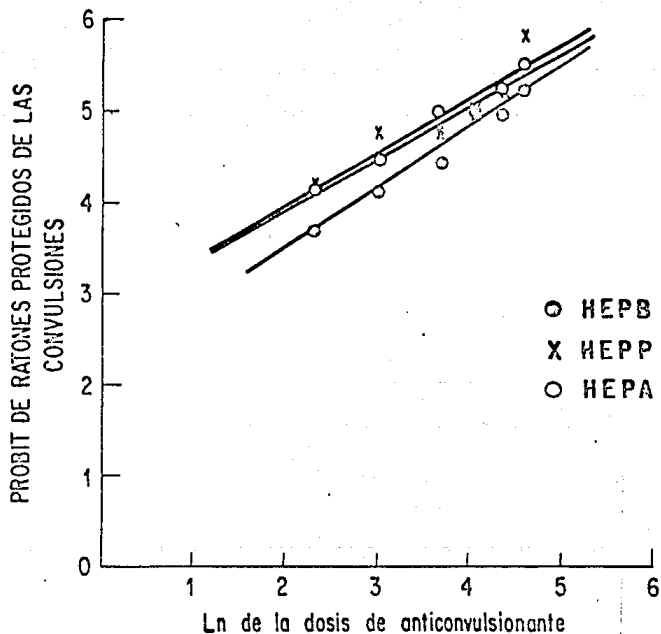


FIGURA 15: CURVAS DOSIS-RESPUESTA DE HEPB Y SUS HOMÓLOGOS CONTRA TSC.

La HEPB y sus homólogos se administran por vía in al tiempo de efecto máximo respecto a TSC (ip). Se evaluó el porcentaje de animales convulsionados. Se probaron 6 dosis de 10 a 100 mg/kg⁻¹. Las DF₅₀ fueron 72.5, 42.55 y 47.4 para HEPP, HEPP y HEPA respectivamente (los datos originales se muestran en la página vi del apéndice).

10 a 30 min (60% a 20%) que se mantiene hasta los 60 min (30%), pero la mayor protección se encuentra a los 10 min (60%).

En cuanto al número de convulsiones tónicas que se cuantifican en C, estas presentan mucha variabilidad con la HEPB que van de 1.0 a 3.0 lo que no sucede con la HEPP; en tanto que la HEPA las aumenta en el rango de 10 a 20 min (1.5 a 2.5), las cuales disminuyen de 30 a 60 min (2.0 a 1.2).

En lo referente al tiempo de latencia, que se puede analizar en D, se encuentra que la HEPB lo incrementa de 10 a 30 min (4,500 a 5,000 seg) y disminuye ligeramente a los 60 min (3,800 seg). En tanto que la HEPP lo aumenta en el intervalo de 10 a 30 min (5,500 a 6,000 seg) y se mantiene casi invariable hasta los 60 min (6,000 seg). Con la HEPA, la latencia se encuentra casi constante en el rango de 10 a 60 min, pero el mayor tiempo se muestra a los 10 min (5,350 seg.).

Así que de acuerdo a las variables estudiadas anteriormente, se elige como tiempo de administración 30 min para la HEPB, 10 min para la HEPP y 10 min para la HEPA, que se utilizarán en las curvas dosis-respuesta de estos compuestos.

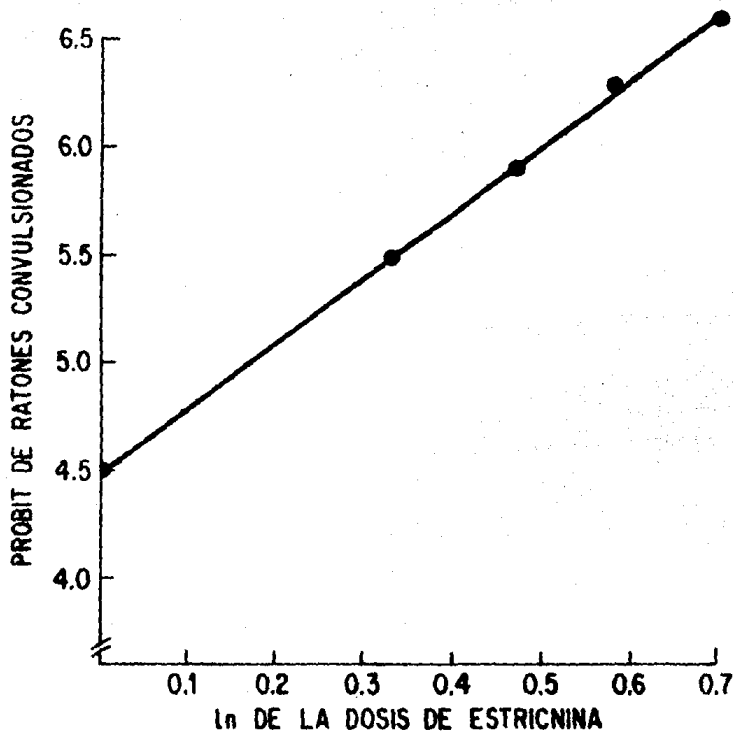


FIGURA 16 : DETERMINACION DE LA DC_{97} DE LA EST EN RATONES.

La EST se administró a los ratones por vía in, para ello se evaluó el porcentaje de animales que presentaron las convulsiones tónico-clónicas.

Se probaron 5 dosis de 1.0 a 2.0 mg/kg^{-1} . La DC_{97} experimental calculada fué de 2.0 mg/kg^{-1} (los datos originales se muestran en la página vii del apéndice).

En la parte A, se representa el porcentaje de mortalidad, el cual aumenta en relación a la dosis administrada de convulsionante. En lo referente al porcentaje de animales convulsionados se presenta una reciprocidad con la dosis. Y el mayor porcentaje se observa cuando se administran 2 mgKg^{-1} , pero a dosis menores de 0.5 mgKg^{-1} este compuesto resulta ineficaz (parte B). En tanto el número de convulsiones tónicas por animal se mantiene constante (1), debido a que estos mueren por paro cardíaco después de la primera convulsión (parte C). Sin embargo, el período de latencia se encuentra en relación inversa con la dosis y se tiene que con el tratamiento de 0.5 a 2 mgKg^{-1} este disminuye de 475 a 250 seg (parte D).

Determinación del tiempo óptimo de acción de la HEPB, de la HEPP y de la HEPA contra la EST.

En la figura 18, se observan las gráficas, para la determinación del tiempo en el que se presenta el mejor efecto protector de los anticonvulsionantes en estudio, contra la EST.

Al analizar los efectos de la HEPB, en la parte A se muestra que la mejor protección contra la muerte por

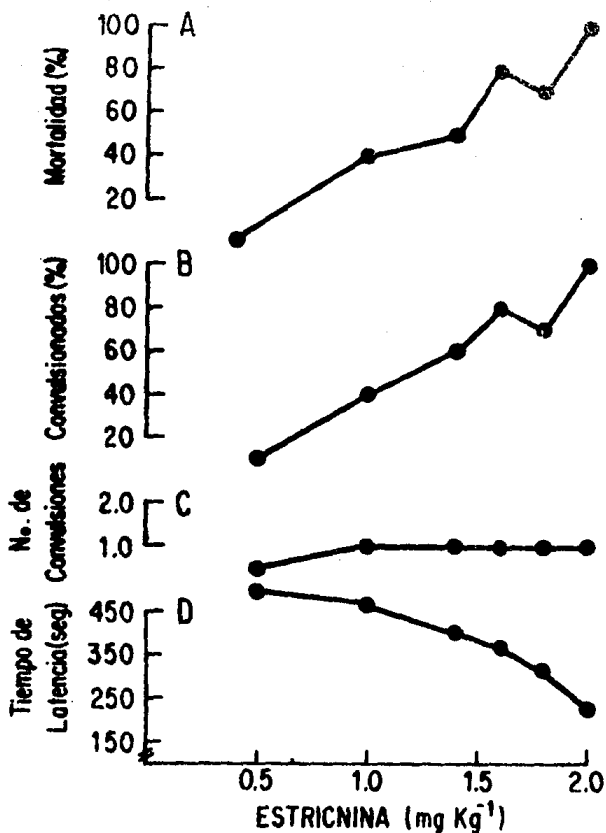


FIGURA 17 : CUANTIFICACION DE LOS DIFERENTES PARAMETROS EN LA DETERMINACION DE LA DC₉₇ DE LA EST.

Al administrar la EST a diferentes dosis por vfa i.p. se cuantifica el núm. de animales muertos y convulsionados, las convulsiones tónicas que presenta cada animal y el tiempo promedio en que aparecen las primeras convulsiones (ver la explicación de la gráfica en la página 48).

convulsión, este compuesto la ejerce en el intervalo de 15 a 30 min (40%) la que se revierte a los 60 min (0%). En tanto que la HEPP disminuye la mortalidad en el intervalo de 15 a 20 min (70-80%) y ésta aumenta entre 30 a 60 min (60-90%). Al examinar la curva de HEPA, se muestra que la mortalidad merma paulatinamente en el intervalo de 10 a 30 min hasta llegar a una protección óptima del 80% (30 min) efecto que se revierte lentamente y a los 60 min, aún salvaguarda a un 40% de los animales.

En lo referente al número de sujetos convulsionados, la curva de HEPB presenta el mismo comportamiento que el parámetro anterior (parte A) y el efecto protector óptimo se presenta al mismo tiempo que el de mortalidad (40% a 30 min). En la gráfica correspondiente a HEPP, la curva de sujetos que convulsionan se comporta igual que la de mortalidad, así que el mejor efecto se observa también en el intervalo de 10 a 20 min (50-60% de protección). Para la HEPA, la curva de animales convulsionados es similar también a la de mortalidad, así que el efecto óptimo se observa claramente a los 30 min (70%) como se muestra en la parte B).

En cuanto al promedio de convulsiones que presenta cada animal, con los 3 compuestos es 1 y no hay variabi-

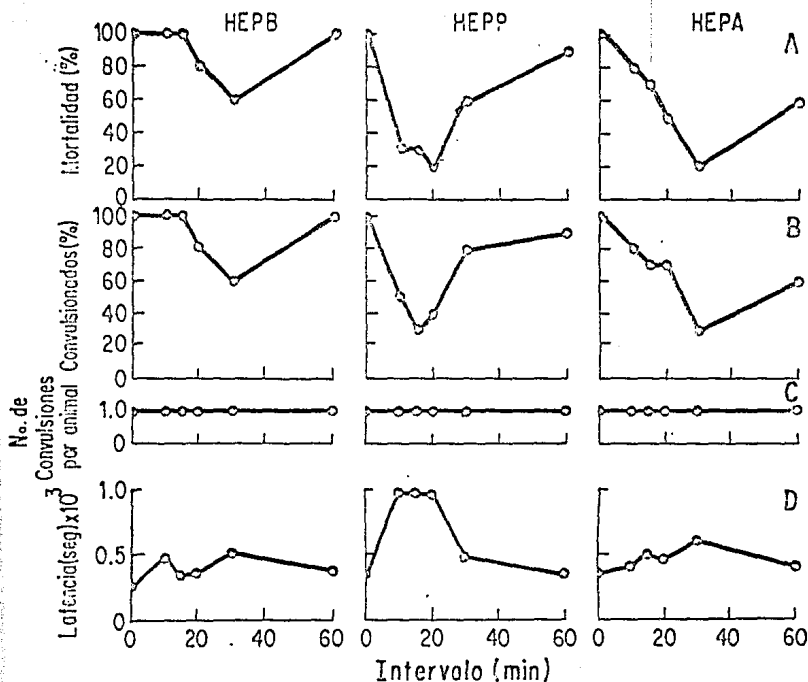


FIGURA 19: DETERMINACION DEL TIEMPO DE ACCION OPTIMA DE LA HEPB, DE HEPP Y DE HEPA CONTRA ESTRICNINA.

Los antiepilepticos se administraron por vía ip a diferentes tiempos (80 mg kg^{-1}), antes de inducir las convulsiones con EST (2 mg kg^{-1}), la cual se administra por vía ip, se cuantifican: el porcentaje de animales muertos por convulsión y el de convulsionados, el número de convulsiones por animal y la latencia promedio en la aparición de las convulsiones (ver explicación de la gráfica en la página 50).

lidad en tiempo estudiado, como se observa en G.

Al considerar el período de latencia (parte D), con HEPB se presenta incremento en el intervalo de 10 a 30 min, pero que se revierte lentamente a 60 min; con HEPP, la latencia se incrementa 2.5 veces en el intervalo de 10 a 20 min (400 a 1000 seg) y se revierte bruscamente entre 30 a 60 min (500 a 350 seg), en tanto que con la HEPA la latencia se incrementa paulatinamente de 10 a 30 min hasta llegar a 620 seg y posteriormente disminuye (400 seg en 60 min).

En consecuencia al analizar los 4 parámetros estudiados se concluye, que el tiempo óptimo para la HEPB, la HEPP y la HEPA se tiene a los 30, 15 y 30 min respectivamente.

Curvas dosis-respuesta de HEPB, HEPP y HEPA contra EST.

En la figura 19, se aprecia la determinación de la DE_{50} de los anticonvulsivos en investigación contra la EST.

En la tabla II, se pueden observar los valores que se obtienen para la DE_{50} con sus límites fiduciales y las ecuaciones ajustadas para cada anticonvulsivo.

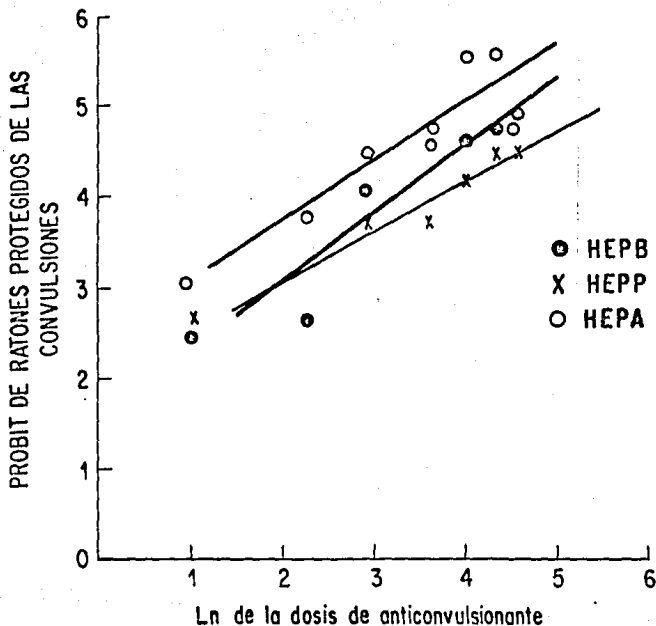


FIGURA 10: CURVAS DOSIS-RESPUESTA DE LA HEPB Y SUS 2 HOMOLOGOS INFERIORES (HEPP Y HEPA) CONTRA LA EST.

Los anticonvulsivos fueron administrados por vía i.p. a los 30, 15 y 30 min respectivamente antes que la EST (i.p.). Se evaluó el porcentaje de animales con convulsiones tónico-clónicas. Se probaron 5 dosis entre 20 y 100 mgKg^{-1} para HEPP y 6 dosis entre 10 y 100 para HEPB y HEPA. Las DE_{50} fueron 106 y 56 para HEPB Y HEPA., para HEPP no se puede calcular (datos en el viii del apéndice).

PICROTOXINA

Cálculo de la dosis convulsiva 97 (DC_{97}).

En la figura 20, se muestra la curva con la cual se determina la DC_{97} de este convulsionante. La ecuación de la recta ajustada es:

$$y = 3.65 x - 0.744 \quad (R = 0.851)$$

donde: y = probit de ratones convulsionados.

x = logaritmo natural de la dosis de PIC.

R = coeficiente de correlación de la recta.

Las curvas dosis-respuesta con las que se determina la DC_{97} de la PIC se grafican en la figura 21: en la parte A se aprecia que la mortalidad se incrementa con respecto a la dosis administrada (4 a 7 $mgKg^{-1}$) y el mayor efecto se detecta de 6 a 7 $mgKg^{-1}$ (100%). La gráfica de la parte B que corresponde a la de animales convulsionados tiene el mismo comportamiento que la gráfica de la parte A y el mejor efecto convulsionante de la PIC se obtiene también con 6 $mgKg^{-1}$.

El número de convulsiones promedio por sujeto (parte C), presenta una variabilidad poco significativa en el tiempo estudiado y lo mismo sucede con el periodo de

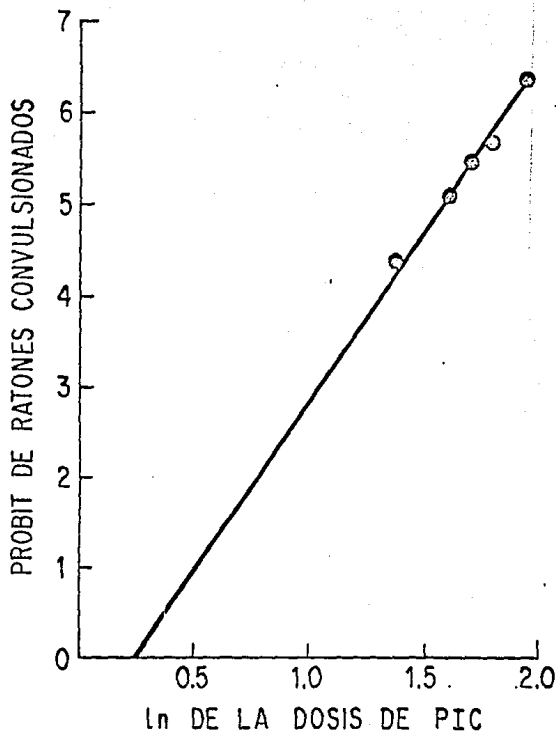


FIGURA 29 : DETERMINACIÓN DE LA DC_{97} DE LA PIC EN RATONES.

La PIC se administró a los ratones por vía sc.

Se evaluó el porcentaje de animales que presentaron convulsiones tónico-clónicas. (6)

Se probaron 5 dosis entre 4 y 7 $mgKg^{-1}$. La DC_{97} experimental fue de 6 $mgKg^{-1}$ (los datos originales se encuentran en la página ix del apéndice).

latencia (parte D).

Tiempo óptimo para determinar el mejor efecto anticonvulsionante de HEPA, HEPP y HEPB contra PIC.

Puesto que la protección máxima de HEPA contra otros convulsionantes estudiados previamente se obtiene en el intervalo de 15 a 30 min, se administran 80 mgKg^{-1} del anticonvulsionante a esos tiempos antes de inducir las convulsiones con PIC para determinar el efecto anticonvulsionante óptimo contra éste compuesto.

Sin embargo, bajo estas condiciones no se detectó el efecto protector de la HEPA ante las convulsiones inducidas con la PIC. Para determinar el intervalo óptimo entre la administración de HEPB y PIC, se inyectaron 80 mgKg^{-1} del anticonvulsionante: 5, 10, 15, 20, 30 y 60 min antes del tratamiento con PIC, pero no se observó protección alguna. Por esta razón no se realizó una curva dosis-respuesta completa, aún así se probaron 120 mgKg^{-1} de HEPB a 30, 60 y 120 min antes que PIC y bajo ninguna de estas condiciones se obtuvo un efecto protector.

Puesto que la HEPP tiene mayor efecto a los 15 min contra otros convulsionantes estudiados anteriormente,

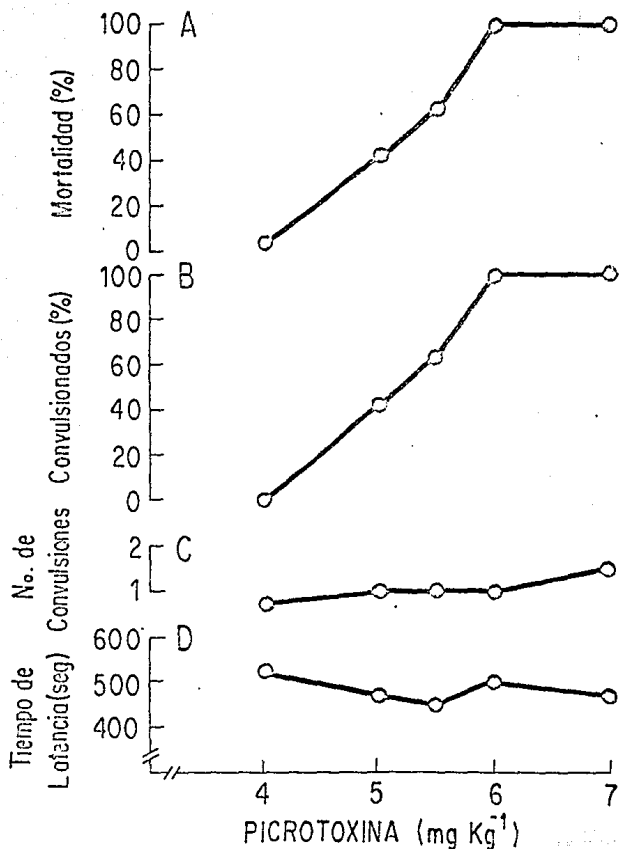


FIGURA 21. CUANTIFICACION DE LOS PARAMETROS EN LA DETERMINACION DE LA DC_{97} DE PIC.

Se cuantifica la mortalidad de animales, el porcentaje de animales convulsionados, el núm. de convulsiones tónicas por animal y el tiempo de latencia, al administrar la PIC por vía se a diferentes dosis (ver explicación de la gráfica en la página 54).

se decidió administrar 80 mgKg^{-1} del anticonvulsionante a ese tiempo para determinar el efecto protector máximo contra la PIC. En contraposición a sus dos homólogos, con HEPP sí se obtiene una protección del 37.5%. Por lo que se realizó la curva dosis-respuesta a este tiempo y con tratamiento de 80, 100, 120 y 130 mgKg^{-1} . A pesar de administrar estas dosis, el porcentaje de mortalidad y de animales convulsionados no varío, pues se mantuvo constante.

Como no se pudo determinar la DE_{50} de la HEPP, no se presenta una curva dosis-respuesta contra la PIC (para mayor información consultar la tabla II).

T A B L A II

ANALISIS ESTADISTICO DE LAS CURVAS DOSIS-RESPUESTA DE LOS ANTICONVULSIONANTES
(HEPB, HEPP' Y HEPA) ANTE VARIOS MODELOS DE CONVULSIONES.

CONVULSIONANTES	ANTICONVULSIONANTES	ECUACION	R	DE ₅₀	LIM. FID. 95°
4-AP	HEPB	$y=0.73 x + 2.54$	0.89	29.0	16.0 -51.0
	HEPP	$y=0.66 x + 3.07$	0.88	18.91	10.21-35.06
	HEPA	$y=0.67 x + 2.92$	0.89	23.51	12.73-43.40
BIC	HEPB	$y=0.93 x + 1.85$	0.93	29.76	17.84-49.65
	HEPP	$y=0.57 x + 2.92$	0.81	37.95	24.60-88.12
	HEPA	$y=0.71 x + 2.61$	0.89	28.84	16.63-50.03
TSC	HEPB	$y=0.66 x + 2.18$	0.99	72.45	39.97-131.32
	HEPP	$y=0.62 x + 2.69$	0.98	42.55	22.55-80.28
	HEPA	$y=0.57 x + 2.82$	0.98	47.37	24.43-91.76
EST	HEPB	$y=0.72 x + 1.65$	0.85	106.14	53.65-209.88
	HEPP	La máxima protección que se obtiene es 30%.			
	HEPA	$y=0.63 x + 2.46$	0.82	56.12	29.71-102.25
PIC	HEPB	No hay protección.			
	HEPP	La máxima protección que se obtiene es 37%.			
	HEPA	No hay protección.			

DISCUSION.

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTICONVULSIONANTE.

La actividad anticonvulsionante de la HEPB y de sus homólogos inferiores (HEPP y HEPA) se evaluó previamente ante dos modelos prototipos (34) para indagar en que tipo de epilepsia serían más útiles.

Los resultados de este trabajo indicaron que estos compuestos son más efectivos contra PTZ que ante ESM y que de acuerdo a Garzón de la Mora (17) podrían ser eficaces en la epilepsia generalizada de tipo ausencia. Para completar esta fase se requería determinar el espectro de acción anticonvulsionante que se realizó en esta tesis.

POTENCIA ANTICONVULSIONANTE: ANALISIS DE LAS DE₅₀S E ITs.

Para facilitar el análisis integral del poder anticonvulsionante de los 3 compuestos, se utilizó una batería de convulsionantes con diferente mecanismo de acción, los resultados de los espectros anticonvulsionantes se encuentran resumidos en la tabla III.

TABLA III

POTENCIA ANTICONVULSIONANTE

CONVULSIONANTES	ANTICONVULSIONANTES					
	HFPB		HEPP		HEPA	
	DE ₅₀	IT	DE ₅₀	IT	DE ₅₀	IT
* Electrochoque (30-35 mA/200 ms)	148	0.75	144	1.48	126	1.04
* Pentilentetrazol (.72 mgKg ⁻¹)	63	1.76	63	3.39	67	1.97
4-Aminopiridina (15 mgKg ⁻¹)	29	3.82	19	11.26	24	5.50
Bicuculina ₁ (3.35 mgKg ⁻¹)	30	3.70	38	5.63	29	4.55
Tiosemicarbazida (20 mgKg ⁻¹)	73	1.52	43	4.97	47	2.80
Estricnina (2 mgKg ⁻¹)	106	1.04	protección máxima 30%		56	2.36
Picrotoxina	no hay pro- tección		protección máxima 37.5%		no hay pro- tección	

Los índices terapéuticos IT (DT_{50}/DE_{50}) se calcularon con las DT_{50} obtenidas por Sánchez G., 1987 así como los resultados correspondientes a las pruebas MES y PTZ* .

En lo referente a las DE_{50} s (expresadas en $mgKg^{-1}$) la HEPA, la HEPP y la HEPB son igualmente efectivos ante: PTZ (HEPB y HEPP-63; HEPA-67); 4-AP (HEPB-29; HEPP-19; HEPA-24); BIC (HEPB-30; HEPP-38; HEPA-29). En tanto que presentan diferencias ante: ESM (HEPB y HEPP-148 y 144 respectivamente; HEPA-126); TSC (HEPB-73; HEPP y HEPA-43 y 47 respectivamente); EST (HEPA-56; HEPB-106); PIC (HEPB y HEPA no protegen con ninguna de las dosis administradas). La HEPP ante EST y PIC presenta una protección limitada, en el primer modelo a la dosis de $100 mgKg^{-1}$ bloquea solo 30% de las convulsiones y ante PIC a dosis de 80 a $130 mgKg^{-1}$ solo protege a 37.5% de los animales.

El orden de efectividad de HEPA es similar al que presenta la HEPP que tiene correspondientemente las DE_{50} s siguientes: 4-AP (24,19); BIC (29,38); TSC (47,43); EST (56,-); PTZ (67,63) y ESM (126,144). La HEPB tiene un orden de efectividad desigual, porque sus DE_{50} s difieren de la de sus homólogos ante: TSC-73 y EST-106.

Además, una ventaja adicional que presenta la HEPA es que bloquea aceptablemente las convulsiones inducidas con EST, lo que pocos compuestos logran (20, 22, 38 y 39) pero su efecto anticonvulsionante es limitado, debido a que al incrementar su concentración (de 80 a $100 mgKg^{-1}$) la protección se revierte. Podría pensarse que este compuesto actuaría com-

pitiendo con EST por los receptores postsinápticos a glicina y en ese caso a mayores concentraciones se esperaría que fuese más potente, lo cuál inexplicablemente no sucede.

En consecuencia de acuerdo a las DE_{50} s la elección de los fármacos sería en el orden siguiente: HEPA, HEPP y HEPB.

La HEPP es la que presenta los ITs más elevados en 5 de las 7 pruebas resumidas en la tabla IV. Y como lo establece el Programa de Fármacos Antiepilépticos de ellos son aceptables cuatro: 4-AP-11.26; BIC-5.63; TSC-4.97; PTZ-3.39 porque son superiores a 2.

En segundo término está la HEPA que ante 4 de los modelos estudiados presenta ITs aceptables; que en orden descendente son: 4-AP-5.5; BIC-4.55; TSC-2.8; EST-2.36. De acuerdo a este parámetro el compuesto menos efectivo es la HEPB que solo muestra ITs apropiados ante: 4-AP-3.82 y BIC-3.70.

Los ITs de la HEPP son notoriamente superiores a los de los otros homólogos, porque a pesar de que los 3 compuestos tienen DE_{50} s del mismo orden, este anticonvulsionante tiene la DT_{50} más alta (214 mgKg^{-1}) que la HEPB (111 mgKg^{-1}) y la HEPA (132 mgKg^{-1}) (34).

ESPECTRO DE ACCION ANTICONVULSIONANTE DE LA HEPB
Y SUS HOMOLOGOS, COMPARADO CON LA DE ALGUNOS
FARMACOS ANTIEPILEPTICOS.

En la tabla V se compara el espectro de acción antiepiléptica de la HEPB y sus homólogos con 3 compuestos utilizados en la terapia antiepiléptica.

El fármaco de elección para el tratamiento de la epilepsia generalizada de tipo ausencia es Etosuccimida, en tanto que el Fenobarbital se utiliza en la terapia de epilepsia generalizada tónico-clónica y Valproato se utiliza contra varios tipos de epilepsia. Aunque Difenhidantofina es un fármaco de elección en crisis generalizadas tónico-clónicas no se incluye en esta comparación porque tiene un efecto selectivo favorable ante ESM y es inefectiva contra PTZ, por lo tanto es diferente a los compuestos de esta investigación.

El Fenobarbital, al compararlo con los compuestos de este estudio, tiene las DE_{50} s más bajas ante: ESM-21.8; PTZ-13 y PIC-28; presenta DE_{50} similar a la HEPB y sus homólogos ante BIC; pero es desfavorable contra TSC pues su DE_{50} es mayor que la de HEPP y HEPA y ante EST es poco efectiva con respecto a HEPA.

T A B L A IV

POTENCIA DE ACTIVIDAD ANTICONVULSIONANTE DE LA HEPB, HEPP Y HEPA COMPARADA
CON LA DE ALGUNOS FARMACOS ANTIEPILEPTICOS.

ANTICONVULSIONANTES	ESM		PTZ		4-AP		BIC		TSC		EST		PIC	
	DE ₅₀	IT ₅₀	DE ₅₀	IT ₅₀	DE ₅₀	IT ₅₀	DE ₅₀	IT ₅₀	DE ₅₀	IT ₅₀	DE ₅₀	IT ₅₀	DE ₅₀	IT ₅₀
HEPB	148	0.75	63	1.76	29	3.82	30	3.70	73	1.52	106	1.04	++ en 120	
HEPP	144	1.48	63	3.39	19	11.26	38	5.63	43	4.97	protección máxima 30%		protección máxima 37.5%	
HEPA	126	1.04	67	1.97	24	5.50	29	4.55	47	2.80	56	2.36	++ en 100	
+FENOBARBITAL	21.8	3.20	13	5.2	**		38	1.83	63*	1.09	95	0.72	28	2.51
+ETOSUCCIMIDA	1000	0.4	130	3.4	**		459	0.96	770*	0.57	protección máxima 62.5% en 250-1000		243	1.82
+VALPROATO	272	1.6	149	2.9	**		360	1.18	**		293	1.45	387	1.10

* Datos obtenidos de Banziger, R. & Hane, D. 1967.

** Datos no disponibles

+ Datos obtenidos de Swinyard, E. A. et al 1986.

++ El anticonvulsivante no protege contra ese compuesto en las dosis indicadas.

En general la HEPB y sus homólogos son mejores que Valproato, debido a que sus DE_{50} s son mucho menores que las de este compuesto ante todas las pruebas efectuadas. La HEPB, la HEPP y la HEPA en general son mejores que Etosuccimida porque sus DE_{50} s son más bajas.

Si se analizan los ITs, el Fenobarbital es más ventajoso que los compuestos de este estudio ante las pruebas: PTZ-5.2; ESM-3.2 y PIC-2.51, sin embargo ante las pruebas restantes sus ITs no son aceptables porque son menores a 2. Contrariamente, los homólogos de HEPB, presentan ITs adecuados ante el resto de las pruebas: 4-AP (HEPB-3.82; HEPP-11.26; HEPA-5.5); BIC (HEPB-3.7; HEPP-5.63; HEPA-4.55); TSC (HEPP-4.97; HEPA-2.8) y EST (HEPA-2.36).

Retomando los ITs, en orden de efectividad sigue Valproato que solo supera a HEPA y HEPB en la prueba de PTZ y es mejor que los 3 compuestos ante ESM pero sus ITs son inaceptables en las otras pruebas, incluyendo el IT de ESM.

Finalmente Etosuccimida en la prueba de PTZ presenta IT similar a la HEPP, por tanto superior a HEPB y HEPA, pero ante el resto de las pruebas sus ITs son inaceptables.

Puesto que los antiepilépticos son fármacos que se administran prolongadamente, un criterio de selección del Programa de Fármacos Antiepilépticos es que las DE_{50} s deben ser menores a 100 mgKg^{-1} para evitar riesgos de toxicidad renal o hepática que se presentarían con mayor probabilidad con los fármacos que son menos potentes. Así, de acuerdo a este parámetro los homólogos de HEPA tienen ventaja sobre Valproato y Etosuccimida. Sin embargo los compuestos de este estudio ejercen su efecto neurotóxico a dosis menores que la de los antiepilépticos mencionados.

El análisis integral de los resultados demuestran que la HEPA tiene un espectro de acción anticonvulsionante más amplio y de acuerdo a la tabla IV solo es inefectiva ante PIC porque no protege con ninguna de las dosis administradas.

El espectro de acción anticonvulsionante de la HEPA es similar a la de la HEPA excepto que la protección que se logra ante EST y PIC es limitada (30 y 37% respectivamente), aunque convendría realizar una curva dosis-respuesta más amplia ante PIC. En último término se encuentra la HEPA que presenta las DE_{50} s más altas que la de los otros 2 compuestos; además de que no protege contra las convulsiones inducidas con PIC.

Es importante resaltar que aunque la HEPB y sus homólogos tienen un espectro anticonvulsionante de amplitud similar al del Fenobarbital, el de este antiepiléptico es diferente al que presentan los compuestos de este estudio.

Aunque Valproato es menos potente que estos compuestos ante la mayoría de las pruebas realizadas, su espectro de acción antiepiléptica es parecido, la principal diferencia es que es poco efectivo ante BIC pero logra proteger contra EST y PIC a concentraciones elevadas.

La HEPP tiene los mejores ITs y las DT_{50} y DL_{50} más alta pero presenta una desventaja respecto a sus homólogos y es que su tiempo de acción óptimo es corto porque probablemente su efecto es poco duradero, pues a los 60 min el poder anticonvulsionante se revierte rápidamente como sucede ante 4-AP, BIC y TSC (fig 7, 11 y 19). En seguida se coloca la HEPA con ITs y DT_{50} intermedios y cuya DL_{50} es similar a la que presenta la HEPB que tiene ITs bajos y la menor DT_{50} .

INFLUENCIA DE LA CADENA CARBONADA.

Si se analizan las DE_{50} s de la HEPB y sus homólogos, no se observa la influencia de la longitud de la cadena de carbono sobre la potencia anticonvulsionante, puesto que ante: 4-AP, BIC y PTZ los tres compuestos son iguales. Además ante TSC HEPB es la menos potente que los otros 2 homólogos que presentan potencia similar. Contrariamente ante EST la HEPA es más efectiva que HEPB y la HEPP presenta una protección limitada.

Además de que los compuestos con longitud de cadena extrema (HEPB y HEPA) presentaron las DE_{50} s más parecidas ante: EST y PIC, tienen las DT_{50} (111 y 132) y las DL_{50} (473.8 para ambos) similares. Y aún más, estos compuestos no manifestaron el efecto de hiperactividad motora detectado con la HEPP que posee la cadena carbonada de longitud intermedia.

En relación a la hiperactividad motora de HEPP, es interesante recordar a otro fármaco que presenta un efecto similar, la feneturida (47). Gold-Aubert describió que el racemato presenta acción anticonvulsionante, sin embargo

el esteroisómero D tiene una acción nsicomotora estimulante, mientras que el esteroisomero L produce denresión motora (una mezcla de 35% del esteroisomero D y 65% del esteroisomero L produce un equilibrio de estos efectos).

Es pertinente tomar en cuenta que la HEPP es una molécula quiral y que en esta investigación se utilizó la mezcla racémica, por lo que serfa conveniente separar los enantiómeros para investigar si uno de ellos es el responsable del efecto de hiperactividad motora y si otro causa el efecto anticonvulsionante o si ambos enantiómeros presentan los dos efectos.

Las características farmacológicas de la HEPB y sus homólogos inferiores, se complementarían con los resultados comparativos de los estudios: fisiológicos, neuroquímicos, toxicológicos y teratológicos que ratificarían si la cadena carbonada no influye en el poder anticonvulsionante.

MECANISMO DE ACCION.

En general los antiepilepticos actuan aumentando el efecto inhibitorio del sistema GABAérgico y glicinérgico o decrementando los sistemas de neurotransmisi3n excitatorio para restablecer el equilibrio (35).

Inicialmente se propuso que estos compuestos podían actuar como análogos de GABA que al inhibir la GABA-T, aumentarían la concentraci3n de GABA (7). Otros mecanismos propuestos son: incremento de la síntesis, la liberaci3n, la recaptaci3n o modificaci3n de los receptores postsinápticos (43). Sin embargo estudios sobre el sistema GABAérgico demostraron claramente que la HEPB no altera la concentraci3n intracerebral de GABA, su liberaci3n, ni los receptores postsinápticos (40):

Tambi3n se ha propuesto que estos compuestos actuan en el sistema GABAérgico a trav3s del multireceptor a GABA-Benzodiazepinas (43). Por ello, en este laboratorio se probaron los 3 compuestos en el desplazamiento de Flunitrazepam-H³ unido a los receptores benzodiazepínicos de las membranas cerebrales, por el método de formaci3n del complejo ligando-receptor (binding). Se encontr3 que los 3 anticonvulsivos en concentraciones de 50 a 100 mM desplazan solo 15% del Flunitrazepam-H³ ligado al receptor por lo que se consi-

dera que la acción de estos fármacos no es a través del multireceptor GABA-Benzodiacepinas (11).

El espectro de acción anticonvulsionante indica que estos compuestos pueden actuar a través del sistema GABAérgico puesto que son muy efectivos contra BIC, como ya se había demostrado previamente para HEPB (40), sin embargo son poco efectivos contra el ácido β -mercaptopropiónico, alliglicina (2) y picrotoxina que también alteran el sistema inhibitorio.

Por otro lado, llama la atención que HEPB es la más efectiva de los 3 compuestos ante las convulsiones inducidas con EST, un antagonista de los receptores del neurotransmisor inhibitorio Glicina y por ello en este laboratorio se está investigando su efecto sobre los receptores a Glicina utilizando el mismo método (binding) con estriocina tritiada (11).

A pesar de los esfuerzos emprendidos para encontrar el mecanismo de acción molecular de la HEPB y sus homólogos este permanece desconocido, como sucede con algunos antiepilepticos como Difenhidantofna, aunque ha sido ampliamente estudiado y utilizado en la terapia.

CONCLUSIONES.

1. Respecto a las DE_{50} s las de la HEPP son similares a las que presenta la HEPA ante: PTZ, 4-AP, BIC y TSC y la principal diferencia se encuentra ante EST y PIC, pues la HEPA es más efectiva que sus homólogos en el primer modelo, mientras que la HEPP es mejor que HEPA y HEPB contra PIC.
2. Los ITs de HEPP son más altos ante: 4-AP, BIC, TSC y PTZ que los de HEPB y HEPA. Sin embargo HEPA tiene ante EST un IT superior al de los otros compuestos.
3. Los resultados de la toxicidad investigada en estudios complementarios (34) demuestran que la HEPP es la menos tóxica debido a que la DT_{50} y la DL_{50} son más elevadas que las de los otros dos compuestos que presentan valores similares.
4. El espectro de acción anticonvulsionante es amplio y similar para los 3 compuestos y las diferencias se presentan ante EST y PIC. La HEPA es dos veces más efectiva que la HEPB ante EST, pero ambos compuestos son inefectivos ante PIC. Sin embargo la HEPP tiene una protección limitada ante estos 2 convulsionantes.

5. Una desventaja de HEPP es que su efecto anticonvulsionante revierte en un tiempo menor que sus homólogos lo que significa que su efecto es poco duradero.
6. Al comparar los 3 anticonvulsionantes con antiepilépticos de uso clínico, en lo referente a sus DE_{50} s, estos tienen ventaja sobre Valproato y Etosuccimida; pero respecto a Fenobarbital están en desventaja ante: ESM, PTZ y PIC. Sin embargo Fenobarbital tiene DE_{50} s similares a estos compuestos ante BIC, TSC y EST.
7. Los ITs de los 3 compuestos, objeto de este estudio, son similares y en algunos casos superiores a los de Fenobarbital, claramente superiores a los de Valproato y Etosuccimida. De los compuestos estudiados sobresale la HEPP ante: 4-AP, BIC y TSC.
8. Los tres compuestos de este estudio presentan un espectro anticonvulsionante tan amplio como el de Valproato y mejor que el de Etosuccimida, sin embargo respecto a Fenobarbital la amplitud de su espectro es similar pero este antiepiléptico es mejor en unas pruebas y los compuestos que nos ocupan son superiores en otras.

9. En base a su espectro anticonvulsionante y su poder anticonvulsivo, su probable utilización terapéutica sería:
- a) en la epilepsia generalizada de tipo ausencia por ser más efectivos ante PTZ que ante ESM.
 - b) en varios tipos de epilepsia como lo hace Valproato por poseer un espectro anticonvulsionante tan amplio como el de este antiepiléptico.
 - c) la HEPP podría administrarse en comedición con antiepilépticos que producen depresión del SNC como Fenobarbital o Difenhidantofina en la epilepsia tónico-clónica por presentar el efecto de hiperactividad motriz.
10. Tomando en cuenta: el poder anticonvulsionante, el espectro de acción anticonvulsionante y la toxicidad que presentan los 3 compuestos en estudio, el orden de elección para terminar los estudios preclínicos es: HEPP, HEPA y HEPB.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

PERSPECTIVAS

En base a los resultados de esta tesis se propone que con la MEPP y como segunda opción con la MEPA se continuen los estudios preclínicos siguientes:

1. Separación de los enantiómeros de la mezcla racémica para determinar si alguna de las formas es responsable del efecto anticonvulsionante o del efecto tóxico preferentemente.
2. Estudios toxicológicos y teratológicos de las mezclas racémicas y de los enantiómeros.
3. Toxicología conductual para caracterizar la hiperactividad motora de la MEPP lo que permitiría determinar si este efecto puede ser beneficioso por sí mismo o en comedicación y para evaluar el efecto que tienen las mezclas racémicas y los enantiómeros sobre el proceso aprendizaje-memoria.
4. La MEPP y la MEPA al igual que compuestos anticonvulsionantes en fase experimental tales como: Zonisamida, Felbamato, Lamotrigina, Nafimidona y Flunizamida (48) podrían pasar a la fase de investigación clínica una vez concluido el estudio toxicológico y teratológico.

APENDICE

Los datos obtenidos de las curvas dosis-respuesta de los compuestos convulsionantes y de los anticonvulsionantes en estudio se presentan en esta sección. Para efectuar el análisis estadístico de tales datos se correlaciona el logaritmo natural de la dosis administrada contra el probit de animales que convulsionan y de los protegidos de las convulsiones respectivamente. En cada tabla se indica a que figura corresponden los datos descritos.

TABLA I

4-AMINOPIRIDINA

DOSIS (mgKg ⁻¹)	RESPUESTA (C/T)	CONVULSIONADOS (%)
0	0/5	0
6	0/5	0
7	0/5	0
8	2/11	18
9	2/8	25
10	8/23	35
11	2/5	40
12	11/18	61
13	6/8	75
14	14/15	93

TOTAL 9 DOSIS ANIMALES 98.

Datos que se destinan para la determinación de la dosis convulsiva 97 de la 4-AP (T=número de animales tratados; C = número de animales convulsionados, % = porcentaje de convulsionados) (Figura 4).

NOTA: La dosis 0 corresponde a los animales testigo.

T A B L A II

ANALISIS ESTADISTICO DE LAS CURVAS DOSIS-RESPUESTA DE LOS ANTICONVULSIONANTES
(HEPB, HEPP Y HEPA) ANTE VARIOS MODELOS DE CONVULSIONES.

CONVULSIONANTES	ANTICONVULSIONANTES	EQUACION	R	DE ₅₀	LIM. FID. 95%
4-AP	HEPB	$y=0.73 x + 2.54$	0.89	29.0	16.0 -51.0
	HEPP	$y=0.66 x + 3.07$	0.88	18.91	10.21-35.06
	HEPA	$y=0.67 x + 2.92$	0.89	23.51	12.73-43.40
BIC	HEPB	$y=0.93 x + 1.85$	0.93	29.76	17.84-49.65
	HEPP	$y=0.57 x + 2.92$	0.81	37.95	24.60-88.12
	HEPA	$y=0.71 x + 2.61$	0.89	28.84	16.63-50.03
TSC	HEPB	$y=0.66 x + 2.18$	0.99	72.45	39.97-131.32
	HEPP	$y=0.62 x + 2.69$	0.98	42.55	22.55-80.28
	HEPA	$y=0.57 x + 2.82$	0.98	47.37	24.43-91.76
EST	HEPB	$y=0.72 x + 1.65$	0.85	106.14	53.65-209.88
	HEPP	La máxima protección que se obtiene es 30%			
	HEPA	$y=0.63 x + 2.46$	0.82	56.12	29.71-102.25
PIC	HEPB	No hay protección.			
	HEPP	La máxima protección que se obtiene es 37%.			
	HEPA	No hay protección.			

TABLA III

B I C U C U L I N A

DOSIS (mgKg ⁻¹)	RESPUESTA (C/T)	CONVULSIONADOS (%)
0	0/5	0
2.9	3/11	27
3.0	3/10	30
3.2	5/10	50
3.3	7/10	70
3.4	9/10	90

5 DOSIS

56 ANIMALES

Datos que se utilizan para la determinación de la dosis convulsiva 97 de la bicuculina (T = número de animales tratados; C = número de animales convulsionados; % = porcentaje de convulsionados) (Figura 8).

TABLA IV

CURVAS DOSIS-RESPUESTA CONTRA LA BIC.

DOSIS (mgKg ⁻¹)	HEPB		HEPP		HEPA	
	RESPUESTA (P/T)	CONVULSIONADOS (%)	RESPUESTA (P/T)	CONVULSIONADOS (%)	RESPUESTA (P/T)	CONVULSIONADOS (%)
0	9/10	90	6/6	100	9/10	90
10	6/8	75	6/7	85	7/10	70
20	6/8	75	7/10	70	6/10	60
40	4/9	44	6/10	60	6/10	60
60	3/9	33	3/10	30	4/10	40
80	1/9	11	2/10	20	2/10	20
100	1/8	13	6/10	60	1/10	10
6 DOSIS	61 ANIMALES		63 ANIMALES		70 ANIMALES	

Ratos empleados para la obtención de las IE₅₀ para la HEPB, la HEPP y la HEPA contra las convulsiones inducidas con BIC (T = número de animales tratados; P = número de animales protegidos de las convulsiones; % = porcentaje de convulsionados). Figura 11.

TABLA V

TIOSEMICARBAZIDA

DOSIS (mgKg ⁻¹)	RESPUESTA (C/T)	CONVULSIONADOS (%)
0	0/5	0
5	0/10	0
10	3/10	30
15	7/10	70
20	10/10	100
25	10/10	100

5 DOSIS

55 ANIMALES

Para la determinación de la dosis convulsiva 97 de la tiosemicarbazida se emplean los datos siguientes: (T = número de animales que convulsionan; % = Porcentaje de los anteriores). (Figura 12).

TABLA VI

CURVAS DOSIS-RESPUESTA CONTRA LA TSC.

DOSIS (mgKg ⁻¹)	HEPB		HEPP		HEPA	
	RESPUESTA (P/T)	CONVULSIONADOS (%)	RESPUESTA (P/T)	CONVULSIONADOS (%)	RESPUESTA (P/T)	CONVULSIONADOS (%)
0	10/10	100	10/10	100	10/10	100
10	9/10	90	6/7	86	6/7	86
20	8/10	80	6/10	60	7/10	70
40	7/10	70	6/10	60	5/10	50
60	5/10	50	5/10	50	5/10	50
80	5/10	50	4/10	40	4/10	40
100	4/10	40	2/10	20	3/10	30
6 DOSIS	70 ANIMALES		67 ANIMALES		67 ANIMALES	

En la determinación de las curvas dosis-respuesta de la HEPB, la HEPP y de la HEPA contra las convulsiones inducidas con la TSC se utilizaron los datos anteriores (T = número de animales tratados; P = número de animales protegidos de las convulsiones; % = porcentaje de animales convulsionados) Ver figura 15.

TABLA VII

E S T R I C N I N A

DOSIS (mgKg ⁻¹)	RESPUESTA (C/T)	CONVULSIONADOS (%)
1.0	4/10	40
1.4	6/10	60
1.6	7/10	70
1.8	8/10	80
2.0	10/10	100

5 DOSIS

50 ANIMALES

La dosis convulsiva 97 de la estricnina se calculó con los datos siguientes: (T = número de animales tratados con el convulsionante; C = número de animales que convulsionan; % = porcentaje de los animales convulsionados). (Figura 16).

TABLA VIII

CURVAS DOSIS-RESPUESTA CONTRA LA EST.

DOSIS (mgKg ⁻¹)	HEPB		HEPP		HEPA	
	RESPUESTA (P/T)	CONVULSIONADOS (%)	RESPUESTA (P/T)	CONVULSIONADOS (%)	RESPUESTA (P/T)	CONVULSIONADOS (%)
0	10/10	100	10/10	100	10/10	100
10	5/5	100			9/10	90
20	5/6	83	9/10	90	7/10	70
40	4/6	67	9/10	90	6/10	60
60	4/6	67	9/10	90	3/10	30
80	3/5	60	7/10	70	3/10	30
100	3/5	60	7/10	70	6/10	60
6 DOSIS	48 ANIMALES		60 ANIMALES		70 ANIMALES	

Datos para determinar las curvas dosis-respuesta de la HEPB, de la HEPP y de la HEPA contra las convulsiones inducidas con la EST (T = número de animales tratados con ambos compuestos; P = número de animales protegidos de las convulsiones; % = porcentaje de animales que convulsionan) Figura 19.

TABLA IX

P I C R O T O X I N A

DOSIS (mgKg ⁻¹)	RESPUESTA (C/T)	CONVULSIONADOS (%)
0	0/5	0
4	0/6	0
5	3/7	43
5.5	4/6	67
6	7/7	100
7	7/7	100

5 DOSIS

38 ANIMALES

Con estos valores se determina la dosis convulsiva 97 de la picrotoxina (T = número de animales tratados con el convulsionante; C = número de animales que convulsionan; % porcentaje de convulsionados). (Figura 29).

TABLA X

HEPP CONTRA PIC.

DOSIS (mgKg ⁻¹)	RESPUESTA (P/T)	CONVULSIONADOS. (%)
0	7/7	100
80	5/8	63
100	7/8	88
120	5/8	63
130	5/8	63
4 DOSIS	39 ANIMALES.	

Para realizar las curvas dosis-respuesta de la HEPB, de la HEPP y de la HEPA contra las convulsiones inducidas con la PIC se utilizan los datos de esta tabla (T = número de animales tratados con el convulsionante y el anticonvulsionante; P = número de animales protegidos de las convulsiones; % = porcentaje de animales que convulsionan).

Con HEPA, no se puede calcular la DE₅₀, puesto que estos compuestos no protegen contra las convulsiones inducidas con PIC a las dosis probadas, ni a varios intervalos de tiempo. Lo mismo ocurre con HEPB.

B I B L I O G R A F I A

1. Alemán-Alemán, V., Martínez de Muñóz, D. "EFFECT OF DIFFERENT CONVULSANT DRUGS ON SOME SEIZURE PARAMETERS IN MORPHINE DEPENDENT MICE", Exp. Neurology 80: 451-456, 1983.
2. Alemán-Alemán, V., Martínez de Muñóz, D. "ESTUDIO SOBRE LA GENERACION DE CONVULSIONES POR DROGAS", Ciencia 36:147-155, 1985.
3. Banziger, R. & Hane, D. "EVALUATION OF A NEW CONVULSANT FOR ANTICONVULSANT SCREENING", Arch. Int. Pharmacodyn: 167 (2): 245-246, 1967.
4. Braestrup, C. & Nielsen, M. "STRYCHNINE AS A POTENT INHIBITOR OF THE BRAIN GABA/BENZODIAZEPINE RECEPTOR COMPLEX", Brain Res Bull 5: 681-684, 1980.
5. Carvajal, G. "BASES BIOQUIMICAS EN EL DESARROLLO DE FARMACOS", Gaceta Médica, México 111: 196-202, 1976.
6. Carvajal, G. "PLANEACION DE FARMACOS ANTIEPILEPTICOS", Epilepsia. Un Enfoque Multidisciplinario. Feria A., Martínez D. y Rubio F. Eds. Trillas México, D.F.: 196-208, 1986.
7. Carvajal, F. y Massieu, F. "GAMA-HIDROXI, GAMA-ETIL, GAMA-FENIL BUTIRAMIDA (HEPB). NUEVO AGENTE ANTICONVULSIONANTE, AGONISTA DEL GABA", Neurobiología. Simposium Internacional. Eds. Velasco-Suárez, M.M y Escobedo, F. Publicado por el Instituto de Neurología y Neurocirugía 120: 103-115, 1978.

8. Carvajal, G., Russek, M., Tapia, R. y Massieu, G. "ANTI-CONVULSIVE ACTION OF SUBSTANCES AS INHIBITORS OF GAMA-AMINO BUTYRIC ACID ALFA-KETOGLUTARIC ACID TRANSAMINASE", Biochemical Pharmacology 13: 1059-1069, 1964.
9. Commission on Classification & Terminology of the International League Against Epilepsy. Epilepsia 22: 489-501, 1981.
10. Comunicación personal de la Dra. Amparo Leal de Carrera de la Sección de Terapéutica Experimental del CINVESTAV-IPN, Calzada México-Xochimilco 77, México 14370, D.F..
11. Comunicación personal de la Dra. Dalila Martínez de Muñoz del Dpto. de Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzado del IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, México 07000, D.F.
12. Curtis, D.R., Duggan, A.W., Johnston, G.A.R. "THE SPECIFICITY OF STRYCHNINE AS A GLYCINE ANTAGONIST IN THE MAMMALIAN SPINAL CORD", Exp. Brain. Res. 12: 547-565, 1971.
13. Curtis, D.R. & Felix, D. "THE EFFECT OF BICUCULINE UPON SYNAPTIC INHIBITION IN THE CEREBRAL & CEREBELLAR CORTICES OF THE CAT", Brain. Res. 34: 301-321, 1971.
14. Curtis, D.R., Duggan, A.W., Felix, D., Johnston, G.A.R. & MacLennan, H. "ANTAGONISM BETWEEN BICUCULINE & GABA IN THE CAT", Brain. Res. 33: 1957-1973, 1971.

15. Chamorro, F., Salazar, S., et al. "EVALUATION IN MICE OF THE TERATOGENIC EFFECT OF GAMA-HIDROXY, GAMA-ETHYL, GAMA-PHENYL BUTYRAMIDE (HEPB) A NEW ANTICONVULSIVANT", Toxicology letter (Enviado a Publicación).
16. Feria-Velasco, A., Velasco, M. y Velasco, F. "ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LA CORTEZA MOTORA EN EPILEPSIA PRODUCIDA EXPERIMENTALMENTE CON CREMA DE ALUMINA EN GATOS", Arch. Investigación Médica, Mexico 5: 1-16, 1974.
17. Garzón de la Mora, P. "ASPECTOS BIOQUIMICOS-FARMACOLOGICOS DE LOS COMPUESTOS ANTIEPILEPTICOS", Epilepsia. Un Enfoque Multidisciplinario. Editores: Feria A., Martínez de Muñoz D. y Rubio F. Editorial Trillas, 168-192, 1986.
18. Glaser, G.H., Kiffin, J. & Woodbury, D. "ANTIEPILEPTIC DRUGS: MECHANISMS OF ACTION" Advances in Neurology. Vol 27, New York. Editorial Raven Press. Cap 15. Convulsant Drugs; Mechanisms of Action. Woodbury D. 1980.
19. Jenney, E.H. & Pfeiffer, C.C. "THE CONVULSANT EFFECT OF HYDRAZIDES & THE ANTIDOTAL EFFECTS OF ANTICOVULSANT & METABOLITES", Journal Pharmacol. Exp. Therapeutical 122: 110-123, 1958.
20. Kadaba, P.K. & Slevin, J.T. "TRIAZOLINES XV. ANTICONVULSANT PROFILE OF ADD 17014, A POTENTIALLY UNIQUE 1,2,3-TRIAZOLINE ANTIEPILEPTIC DRUG, IN MICE AND RATS", Epilepsia 29: 330-337, 1988.
21. Krall, R.L., Penry, J.K. et al "ANTIEPILEPTIC DRUG DEVELOPMENT: II ANTOCNVULSANT DRUG SCREENING", Epilepsia 19: 409-428, 1978.

22. Leander, D.J., Robertson, D.W. et al "PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF ENANTIOMERS OF 4-AMINO-N-(ALFA-METHYLBENZYL) BENZAMIDE, A CHEMICALLY NOVEL ANTICONVULSANT", *Epilepsia* 29: 83-90, 1988.
23. Litchfield, J.T. & Wilcoxon, F.A. "A SIMPLIFIED METHOD OF EVALUATING DOSE-EFFECT EXPERIMENTS", *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96: 99-113, 1949.
24. Lundh, N. "EFFECT OF 4-AMINOPYRIDINE IN NEUROMUSCULAR TRANSMISSION", *Brain Res.* 153: 307-318, 1978.
25. Martínez, D. "ANTICONVULSANT ACTION OF GAMMA-HIDROXY, GAMMA-ETHYL, GAMMA-PHENYL BUTYRAMIDE IN MICE TREATED WITH 4-AMINOPYRIDINE", 11th, *Epilepsy International Symposium*, Florencia, Italia: 463-466, 1979.
26. Martínez, D. y Oscos, A. "EFFECTS OF CYCLIC ANALOGS OF GABA ON PROTEIN SYNTHESIS AND DISCRIMINATION LEARNING", *Psychopharmacology* 54: 149-152, 1977.
27. Mervign, J.E. & Tyrer, J.H. "ANTICONVULSANT THERAPY PHARMACOLOGICAL BASES & PRACTICE" 2th Edition. Editorial Churchill Living Stone, New York, N.Y. Cap. 4: 26-29, 1980.
28. Meza, S.E. "SINTESIS DE 2 NUEVOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTICONVULSIONANTE" Tesis Profesional. ENCB-IPN, México, 1983.
29. Oscos-Alvarado, A., Martínez, D. y Lozano Vargas, P. "EFECTOS DE LAS DROGAS ANTICONVULSIVAS EN LA MEMORIA A CORTO PLAZO EN ANIMALES", *Drogas y Conducta*; Alcaraz V., Colotla A. y Laties, C. Eds. Trillas, México: 125-151, 1983.

30. Otero Siliceo, E. "NUEVAS ESTRATEGIAS EN EL MANEJO DEL PACIENTE EPILEPTICO", *Epilepsia. Un Enfoque Multidisciplinario*. Editores: Feria A., Martínez D. y Rubio F. Editorial Trillas: 248-270, 1986.
31. Pasantes -Morales, H. y Arzate, M.E. "EFFECT OF TAURINE ON SEIZURES INDUCED BY 4-AMINOPYRIDINE", *J. Neurochem. Res.* 6: 465-474, 1981.
32. Pérez de la Mora, M. y Tapia, R. "ANTICONVULSANT EFFECT OF 5-ETHYL, 5-PHENYL, 2-PYRROLIDINONE AND ITS POSSIBLE RELATIONSHIP GAMA-AMINOBUTYRIC ACID DEPENDENT INHIBITORY MECHANISMS", *Biochem. Pharmacol.* 22: 2635-2639, 1973.
33. Rubio Donadieu, F. "GENERALIDADES Y CLASIFICACION DE LA EPILEPSIA", *Epilepsia. Un Enfoque Multidisciplinario*. Eds. Feria A., Martínez D. y Rubio F. Editorial Trillas: 19-27, 1986.
34. Sánchez, R.G. "EVALUACION DE LA POTENCIA ANTICONVULSIONANTE Y DE LA NEUROTOXICIDAD DE LA HEPB Y SUS DOS HOMOLOGOS INFERIORES", Tesis de Maestría. Departamento de Farmacología y Toxicología. CINVESTAV-IPN, México, 1987.
35. Sandoval, M.E. y Torner, C. "NEUROTRANSMISION Y EPILEPSIA", *Epilepsia. Un Enfoque Multidisciplinario*. Feria A., Martínez D. y Rubio F. Editorial Trillas, México:98-139, 1986.

36. Solís, H. y Arauz, J. "MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA", *Epilepsia. Un Enfoque Multidisciplinario*. Editores Fera A., Martínez D. y Rubio F. Editorial Trillas: 74-97, 1986.
37. Solís, H., Jurado, L. y Fernández-Guardiola, A. "LA ACCION DE LA BUTIRAMIDA SOBRE EL DESARROLLO DEL KINDLING AMIGDALINO YA ESTABLECIDO EN EL GATO", *Neurobiología. Simposium Internacional*. Eds. Velasco Suárez, M.M. y Escobedo, F. Publicado por el Instituto Nacional de Neurobiología y Neurocirugía: 84-93, 1978.
38. Swinyard, A. "ASSAY OF ANTI-EPILEPTIC DRUG ACTIVITY IN EXPERIMENTAL ANIMALS: STANDARD TESTS", Mercier J. Ed. *Anticonvulsant Drug Oxford: Pergamon Press*, 65: 47-65, 1972 (International Encyclopedia of Pharmacology & Therapeutics, Section 19: Vol 1).
39. Swinyard, H.A., Sofia, D.R., Kupferberg, H.J. "COMPARATIVE ANTICONVULSANT ACTIVITY & NEUROTOXICITY OF FELBAMATE & 4 PROTOTYPE ANTI-EPILEPTIC DRUGS IN MICE & RATS", *Epilepsia* 27: 27-34, 1986.
40. Tapia, R., Drucker Colin, R.R., Meza-Ruiz, G. y Levy, G. "NEUROPHYSIOLOGICAL AND NEUROCHEMICAL STUDIES ON THE ACTION OF THE ANTICONVULSANT GAMMA-HIDROXY, GAMMA-ETHYL, GAMMA-PHENYL BUTYRAMIDE", *Epilepsia* 20: 135-146, 1979.
41. United States Department of Health, Education & Welfare. Public Health Service National Institutes of Health. "ANTICONVULSANTS SCREENING" Project: Antiepileptic Drug Development Program. Publication of National Institutes of Health 78-1093, Bethesda, Enero 1978.

42. Vasconcelos, D. "EPILEPSIAS", Medicina Interna, Ciclos IX y X Varios editores. Editorial UNAM: 598-620.
43. Martínez de Muñóz, D. "EL PAPEL DE LOS NEUROTRANSMISORES EN LA EPILEPSIA" en Aminoácidos y Peptidos en la Integración de Funciones Nerviosas. Eds. Pasantes H., Arechiga H. Editorial UNAM: 141-157, 1983.
44. Wada, J.A. "PHARMACOLOGICAL PROPHYLAXIS IN THE KINDLING MODEL OF EPILEPSY", Arch. Neurol. 34: 389-395, 1977.
45. Wu, J.Y. & Roberts, E. "PROPERTIES OF BRAIN L-GLUTAMATE DESCARBOXILASE: INHIBITION STUDIES", J. Neurochem. 23: 759-767, 1974.
46. Zenteno, M.T. "SINTESIS DE 3 NUEVOS ANTICONVULSIONANTES: PROPIONAMIDAS TRISUSTITUIDAS EN EL CARBONO 3" Tesis Profesional de la ENCB-IPN, México 1983.
47. Gold-Aubert, P. "SUR LES EFFETS PSYCHOTHERAPEUTIQUES DES ANTIPODES OPTIQUES DE PHENETURIDE", Bradley P.B., Deniker P., Radouco-Thomas. C. Eds. Neuropsychopharmacology. Amsterdam: Elsevier, 1959; (Vol 1): 313-317.
48. Meldrum, B.S. y Porter, R.J. EDS. "NEW ANTICONVULSANT DRUGS" London: John Libbey, 1986.

49. Rettie, A.E. "CYTOCHROME P-450-CATALYZED FORMATION OF DELTA 4-VPA A TOXIC METABOLITE OF VALPROIC ACID", Science 20; 235(4791): 890-893; 1987.