



UNIVERSIDAD VERACRUZANA
CENTRO DE INVESTIGACIONES CEREBRALES

Doctorado en Investigaciones Cerebrales

“Evaluación del potencial anticonvulsivante y ensayos de toxicidad de la 5H-dibenzo(*b,e*)azepin-6,11-diona y la dibenzo(*b,f*)(1,4)diazocin-6,11(5H,12H)-diona”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN INVESTIGACIONES CEREBRALES**

Presenta:

M. C. Eloy Gasca Pérez

DIRECTORES

Dr. F. Rafael Ramos Morales

Dr. Luis Beltrán Parrazal

DIRECTOR

Dr. Fernando Rafael Ramos Morales
Área de Sistemas Cromatográficos
Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica
Universidad Veracruzana
Xalapa, Veracruz

CO-DIRECTOR

Dr. Luis Beltrán Parrazal
Laboratorio de Neurofisiología
Centro de Investigaciones Cerebrales
Universidad Veracruzana
Xalapa, Veracruz

CÓMITE TUTORIAL

Dra. Marcela Galar Martínez
Laboratorio de Toxicología Acuática
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional
México, D.F.

Dra. María Elena Hernández Aguilar
Laboratorio de Neuroendocrinología
Centro de Investigaciones Cerebrales
Universidad Veracruzana
Xalapa, Veracruz

Dr. Jorge Manzo Denes
Laboratorio de Neurociencias
Centro de Investigaciones Cerebrales
Universidad Veracruzana
Xalapa, Veracruz

Dr. Mario Eduardo Acosta Hernández
Facultad de Bioanálisis
Universidad Veracruzana
Xalapa, Veracruz

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica de la Universidad Veracruzana (SARA-UV) bajo la dirección del Dr. Fernando Rafael Ramos Morales y la co-dirección del Dr. Luis Beltrán Parrazal. La parte correspondiente a la actividad anticonvulsiva fue realizada en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Veracruzana a cargo de la Bióloga Mercedes Acosta Avilés. La sección de embriotoxicidad fue realizada en el laboratorio de Neuroendocrinología a cargo de la Dra. María Elena Hernández Aguilar. Finalmente la sección de neurotoxicidad fue realizada en el Laboratorio de Toxicología Acuática de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional a cargo de la Dra. Marcela Galar Martínez.

Esta investigación fue apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante la beca para estudios de Doctorado (339125) otorgada a Eloy Gasca Pérez.

-¿Y por qué lo deseas tanto?
-Porque me dijeron que no lo lograría

Esta Tesis está dedicada a el
Lic. Celso Campos Sánchez
Q.E.P.D.

Agradecimientos

A Dios, porque me ha enseñado que sus tiempos son perfectos, y por darme la oportunidad de cumplir esta meta.

A mi madre, por seguir fielmente mis ideales, por ser la madre más mala del mundo, enseñarme a ser mejor persona, hermano, hijo y estudiante, que este mundo es de los que toman riesgos, gracias por todo, te amo madre.

A mis hermanos, César y Emmanuel, por ser uno de mis motores para salir adelante, y que esto que hoy llega a término les sirva de motivación, que si se quiere se puede.

A mi compañera de vida, mi mejor amiga, mi confidente, la persona que me ha hecho valorar todo lo que soy y todo lo que tengo, que ha estado a mi lado y que hoy me da la oportunidad de ser parte de su vida, Mary, no hay nadie como tú, que me haga sentir así, en un arrullo de estrellas.

Al Sr. Ismael Villegas Herrera por todos sus consejos, que de una u otra forma han influido en mi vida, muchas gracias por todo.

A mi padre, por ser parte de este logro.

A Pam, Omar y Mario, por ser grandes seres humanos, por demostrarme su amistad y cariño, porque a pesar de todo lo que hemos pasado en el ámbito profesional, han sido un apoyo incondicional, para ustedes mi más grande admiración y respeto, los quiero mucho

A lo largo de la vida, hay personas que llegan, personas que se van, y personas que permanecen, y que aun en la distancia siempre tienen una palabra de aliento y te brindan su amistad a pesar de todo. Gracias Tere, Paloma, David, Luz, Amado, Dona, José Luis, Beto, por brindarme su amistad sincera, por sus consejos, por los momentos de diversión, los quiero mucho.

A mi Director de Tesis, Dr. Fernando Rafael Ramos Morales, por ser mi mentor en esta profesión tan hermosa que es la investigación, gracias por los regaños, por los consejos, por dedicarle tiempo a mi formación, mil gracias.

A mi Co-director, Dr Luis Beltrán Parrazal, por enseñarme a ser perseverante y dedicado, que puedo lograr las cosas que me propongo teniendo disciplina, créame que esto fue una enseñanza de vida y me ha dado buenos resultados, le estaré eternamente agradecido.

A la Dra. Marcela Galar Martínez, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme desarrollarme, no hay palabras suficientes para agradecer toda su disposición y dejarme ser parte de su equipo de trabajo.

A mi comité tutorial, Dra. María Elena Hernández Aguilar, Dr. Jorge Manzo Denes y Dr. Mario Eduardo Acosta Hernández, por todas sus aportaciones y correcciones que han enriquecido este trabajo de tesis.

A mis eternos maestros, que ahora me brindan su amistad, Mtro. J.B. Héctor Escobar Henríquez, Mtra. Belén Ortega Planell, muchas gracias por todo su apoyo.

A mis compañeros del Laboratorio de Toxicología Acuática, de la ENCB-IPN, Isabel, Julieta, Itzel y la Dra. Sandra, por brindarme su amistad y apoyarme en el desarrollo del trabajo de mi estancia, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.

A mi familia, especialmente a la Familia Campos Leal, por abrirme las puertas de su casa y de su corazón, Summer, Julio y Tía Rebe, gracias por su amistad y cariño incondicional.

A mis compañeros de los distintos laboratorios de la Unidad SARA y CICE, que siempre tuvieron esas palabras de apoyo cuando me sentía frustrado, Rodrigo, Ivette, Paty, Miguel, Sonia.

A los investigadores del CICE por enseñarme que la investigación es una actividad hermosa, llena de retos y obstáculos, pero con grandes satisfacciones.

A mi segunda familia, que han estado en las buenas y las malas, gracias a las familias Corona y Mondragón, mis padrinos, mis compadres y mis vecinos, todos forman parte de esto.

A mis estudiantes y los que hoy son mis colegas y amigos, Saraí, Rogelio, Alejandra, fueron excelentes aprendices pero también fueron grandes maestros, ya que yo también aprendí de ustedes, sigan adelante para que lleguen más allá de este punto en el que me encuentro.

A las personas que pudiera estar olvidando, por toda su influencia en mi vida.

A todos

Muchas Gracias

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	4
HIPÓTESIS	5
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS ESPECIFICOS	5
CAPÍTULO I MARCO DE REFERENCIA	6
1.1. Epilepsia	6
1.2. Sistema GABAérgico.	8
1.3. Benzodiazepinas	11
1.4. Farmacocinética de las benzodiazepinas	11
1.5. Interacción de las benzodiazepinas y el receptor GABA _A	12
1.6. Análogos de benzodiazepinas con potencial actividad biológica	12
1.7. Toxicidad inducida por fármacos: El caso específico de las benzodiazepinas	13
1.8. Programa de Desarrollo de Drogas Anticonvulsivantes (ADD)	14
CAPÍTULO II EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICONVULSIVA EN UN MODELO MURINO	15
2.1. Antecedentes	15
2.1.1. Modelos de inducción de crisis convulsivas	15
2.2. Metodología	17
2.2.1. Evaluación anticonvulsivante de los compuestos sintetizados	17
2.3. Análisis estadístico	19
2.4. Resultados	19
2.4.1. Potencial anticonvulsivo de los compuestos sintetizados	19
2.5. Discusión	23
CAPÍTULO III EVALUACIÓN DE LA EMBRIOTOXICIDAD EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA	25
3.1. Antecedentes	25
3.1.1. Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	25

3.1.2. <i>Danio rerio</i> como modelo de embriotoxicidad	25
3.2. Metodología	27
3.2.1. Alojamiento de los individuos	27
3.2.2. Cruzas naturales preliminares	27
3.2.3. Implementación del método de puntaje general de desarrollo	28
3.3. Análisis estadístico	30
3.4. Resultados	32
3.4.1. Optimización del sistema de alojamiento de los organismos.	32
3.4.2. Cruzas preliminares	36
3.4.3. Puntaje General de Desarrollo	39
3.4.4. Evaluación de la embriotoxicidad	48
3.5. Discusión	54
CAPITULO IV EVALUACIÓN DE LA NEUROTOXICIDAD EN TEJIDO CEREBRAL MEDIANTE LA EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO	55
4.1. Antecedentes	55
4.1.1. Radicales libres	55
4.1.2. Mecanismos de defensa contra los radicales libres	55
4.1.3. SOD	56
4.1.4. CAT	56
4.1.5. Gpx	57
4.1.6. Estrés oxidativo	57
4.1.7. Efectos del estrés oxidativo a nivel celular	57
4.1.8. Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	58
4.1.9. <i>Cyprinus carpio</i> como modelo de toxicidad por estrés oxidativo	58
4.2. Metodología	60
4.2.1. Evaluación del estrés oxidativo en tejido cerebral de carpa	60
4.2.2. Exposición de los organismos a los compuestos de interés	60
4.2.3. Obtención de las muestras a partir de tejido cerebral	61
4.2.4. Determinación de proteínas totales	61
4.2.5. Determinación de Lpx	62
4.2.6. Determinación de hidroperóxidos	62
4.2.7. Determinación de proteínas oxidadas	62
4.2.8. Determinación de la actividad de CAT	63
4.2.9. Determinación de la actividad de GPx	63

4.3. Análisis estadístico	63
4.4. Resultados	64
4.4.1. Evaluación del daño oxidativo en tejido cerebral de carpa	64
4.4.2. Evaluación de la actividad antioxidante en tejido cerebral de carpa	66
4.5. Discusión	68
CONCLUSIONES	70
PERSPECTIVAS	71
PRODUCTOS	72
ANEXO 1	75
REFERENCIAS	81

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Esquema que muestra los sitios de interacción de ciertas sustancias químicas sobre el receptor GABA _A	10
Figura 2. Estructura de los análogos de benzodiazepinas: 5 <i>H</i> -dibenzo(<i>b,e</i>)azepin-6,11-diona (7A) y dibenzo(<i>b,f</i>)(1,4)diazocin-6,11(5 <i>H</i> ,12 <i>H</i>)-diona (8A).	13
Figura 3. Esquema de la distribución de grupos experimentales para la evaluación del potencial anticonvulsivo de los compuestos sintetizados en ratones macho de la cepa CD1.	18
Figura 4. Esquema de la distribución de los grupos experimentales para obtener las concentraciones mínimas de coagulación de embriones en el modelo de embriotoxicidad en pez cebra.	29
Figura 5. Esquema que muestra el diseño experimental para la evaluación de la embriotoxicidad de los controles farmacológicos y los dos compuestos sintetizados en un modelo de pez cebra.	30
Figura 6. Sistema piloto de alojamiento del pez cebra. A) Peceras suministradas por la red de mangueras; B) Bomba sumergible; C) Filtro de fibra, zeolita, carbón activado y cerámica fijadora de bacterias desnitrificantes.	32
Figura 7. Tanque principal donde se observa la bomba de recirculación de agua (azul) y sistema de filtros al cual llega el drenaje de las peceras (negro).	33
Figura 8. Sistema de tuberías hidráulicas (verde) conectadas al filtro de celulosa (negro) y posteriormente al sistema de enfriamiento (amarillo).	34
Figura 9. Lámpara UV de flujo continuo.	34
Figura 10. Tubería de dispensación de agua (verde) donde se observa una serie de 4 llaves que permiten controlar el flujo de entrada de agua a las peceras por la parte superior.	35
Figura 11. Sistema de drenaje donde se observan los canales de PCV (blanco) que llevan el efluente de agua a una tubería bajante (derecha verde).	36
Figura 12. Se presenta la morfología de un macho (izquierda) donde se observa un cuerpo fusiforme alargado con rayas oscuras características y una tonalidad amarilla en las porciones claras del organismo. En la morfología de la hembra (derecha) se denota un cuerpo de mayor volumen presentando las bandas oscuras características pero con una tonalidad mayormente plata en las	36

regiones claras, además de presentar una papila en su región ventral.	
Figura 13. En el lado izquierdo se observan a los peces sometidos a cruza separados en hembras y machos, mientras que al lado derecho los peces se encuentran interaccionando después de retirada la separación.	37
Figura 14. Huevos fertilizados obtenidos por cruza natural observados al microscopio. Foto tomada por el autor.	38
Figura 15. Etapas del desarrollo de embriones de pez cebra a partir de las 2 hpf (horas post fertilización).	38
Figura 16. Organismos con deformidades congénitas. A) Conducto espinal arqueado y edema pericárdico; B) Conducto espinal y cola arqueada; C) Edema pericárdico.	39
Tabla 1. Puntaje de morfología general propuesto por Hermesen.	40
Tabla 2. Puntaje de morfología general obtenido en tres camadas de embriones (N=60).	41
Figura 17. Desarrollo normal del embrión de pez cebra en el primer punto de corte	43
Figura 18. Desarrollo normal del embrión de pez cebra a las 24 hpf.	43
Figura 19. Desarrollo normal del embrión de pez cebra a las 48 hpf.	44
Figura 20. Desarrollo normal del embrión de pez cebra a las 72 hpf.	45
Tabla 3. Efecto de los tratamientos de mayor concentración en el desarrollo de los embriones del pez cebra.	47
Figura 9. Esquema que muestra el diseño experimental para la evaluación del estrés oxidativo en cerebro de carpa por exposición a CBZ, VP y 8A.	61
Figura A1. Esquema de la reacción propuesta por Paudler y Zeiler	75
Figura A2. Espectro de ¹ H RMN del compuesto dibenzo(b,f)(1,4)diazocin-6,11(5H,12H)-diona a 300 MHz en DMSO- <i>d</i> 6	76
Figura A3. Espectro de ¹³ C RMN para el compuesto B1 a 75.47 MHz en DMSO- <i>d</i> 6	77
Figura A4. A) Cromatograma correspondiente a la dibenzodiazocina. B) Patrón de fragmentación donde se identifica el ion molecular.	78
Figura A5. Esquema de reacción para obtener la 5H-dibenzo[b,e]azepin-6,11-diona (7A).	79
Figura A6. Espectro de ¹ H RMN del compuesto a 300 MHz en Acetona- <i>d</i> 6.	80

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Eficacia anticonvulsiva de los controles farmacológicos (CBZ, CLZ) y de los compuestos sintetizados con respecto a vehículo en porcentaje.	19
Gráfica 2. Efecto de los compuestos sintetizados sobre la latencia a las convulsiones inducidas por PTZ en ratones macho CD1. Cada barra representa la media $\pm$ I. C. valores para n= 6 ratones por tratamiento. *p< 0.05 vs vehículo; **p<0.001 vs vehículo.	20
Gráfica 3. Efecto de los compuestos sintetizados sobre la duración de las convulsiones inducidas por PTZ en ratones macho CD1. Los valores son representados como la media $\pm$ I. C. valores para n= 6 ratones por tratamiento. *Efecto significativo (p<0.05) comparado con el grupo vehículo.	21
Gráfica 4. Efecto de los compuestos sintetizados sobre la recuperación de las convulsiones inducidas por PTZ en ratones macho CD1. Los valores son representados como la media $\pm$ I. C. Valores para n= 6 ratones por dosis. **Efecto significativo (p<0.001) comparado con el grupo vehículo.	22
Gráfica 5. Curva concentración-respuesta de puntaje general de desarrollo	45
Gráfica 6. Curva concentración-respuesta de efectos teratogénicos	46
Gráfica 7 Respuesta de los embriones de pez cebra a la exposición de concentraciones bajas de CLZ, CBZ, VP, 7A y 8A con respecto al grupo V. Cada barra representa a la media $\pm$ I.C. * diferencias significativas cuando p<0.01 en la prueba pos-hoc de Tukey al contrastar con V	49
Gráfica 8. Respuesta de los embriones de pez cebra a la exposición de concentraciones media-bajas de CLZ, CBZ, VP, 7A y 8A con respecto al grupo V. Cada barra representa a la media $\pm$ I.C. * diferencias significativas cuando p<0.01 en la prueba pos-hoc de Tukey al contrastar con V	50
Gráfica 9. Respuesta de los embriones de pez cebra a la exposición de concentraciones media-altas de CLZ, CBZ, VP, 7A y 8A con respecto al grupo V. Cada barra representa a la media $\pm$ I.C. * diferencias significativas cuando p<0.01 en la prueba pos-hoc de Tukey al contrastar con V	51
Gráfica 10. Respuesta de los embriones de pez cebra a la exposición de concentraciones altas de CLZ, CBZ, VP, 7A y 8A con respecto al grupo V. Cada barra representa a la media $\pm$ I.C. * diferencias significativas cuando p<0.01 en la prueba pos-hoc de Tukey al contrastar con V	52

Gráfica 11. Índice de mortalidad de los embriones dependiente del tratamiento	53
Gráfica 12. Contenido de hidropéroxidos en cerebro de carpas tratadas con CBZ, VP y 8A. Los valores expresados son las medias $\pm$ E.E. de nueve individuos.	64
Gráfica 13. Grado de lipoperoxidación en cerebro de carpas tratadas con CBZ, VP y 8A. Los valores son la media de nueve individuos $\pm$ E.E.: * Indica una diferencia significativa con respecto a las 0 h ($p < 0.05$). # Indica una diferencia significativa con respecto a 12 h ($p < 0.05$).	65
Gráfica 14. Contenido de proteínas oxidadas en cerebro de carpas tratadas con CBZ, VP y 8A. Los valores son la media de nueve individuos $\pm$ E.E.	65
Gráfica 15. Actividad de CAT en cerebro de carpas tratadas con CBZ, VP y 8A. Los valores son la media de nueve individuos $\pm$ E.E. * Indica una diferencia significativa con respecto a las 0 h ($p < 0.001$).	66
Gráfica 16. Actividad de Gpx en cerebro de carpas tratadas con CBZ, VP y 8A. Los valores son la media de nueve individuos $\pm$ E.E. * Indica una diferencia significativa con respecto a las 0 h ($p < 0.05$).	67

RESUMEN

La epilepsia es la predisposición permanente de un individuo a presentar una serie de signos y síntomas, denominados crisis. Esta condición mantiene al paciente limitado psicológica y socialmente, debido a la mala aceptación de la enfermedad. La condición epiléptica es incurable, basándose el tratamiento en la reducción de los episodios mediante fármacos que inhiben los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que inician una crisis. Una familia de fármacos utilizados para el tratamiento de las crisis convulsivas son las benzodiacepinas, que se definen químicamente como compuestos heterocíclicos formados por la fusión de un anillo aromático y un anillo heterocíclico de 7 miembros, con dos átomos de nitrógeno en la posición 1 y 4; son liposolubles, por lo que atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica, con lo que aumenta su biodisponibilidad, generando efectos terapéuticos a dosis bajas. Estudios recientes demuestran que moléculas análogas a estos fármacos han presentado actividad biológica, lo que abre un gran panorama en la búsqueda de terapias alternativas a las ya existentes. Actualmente el diseño de moléculas con potencial anticonvulsivo sigue un esquema propuesto por Institutos Nacionales de Salud (NIH por sus siglas en inglés) en conjunto con el Instituto Nacional de Desórdenes Neurológicos en el Ramo de la Epilepsia, donde en primera instancia se elucida el posible efecto anticonvulsivo y posteriormente se evalúan los posibles efectos nocivos de dichos compuestos sobre el Sistema Nervioso Central. Por lo anterior, el presente proyecto se enfocó en evaluar la eficacia anticonvulsiva de dos compuestos heterocíclicos, la 5H-dibenzo[*b,e*]azepin-6,11-diona (7A) y la dibenzo(*b,f*)(1,4)diazocin-6,11(5H,12H)-diona (8A) en ratones macho de la cepa CD1. Posteriormente, se realizó un primer perfil toxicológico mediante la evaluación de la embriotoxicidad en un modelo de pez cebra (*Danio rerio*) y la cuantificación del contenido de hidroperóxidos (Hpx), nivel de lipoperoxidación (Lpx) y proteínas oxidadas (Pox), así como la actividad de catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (Gpx) en tejido cerebral de carpas comunes (*Cyprinus carpio*). Los resultados obtenidos muestran que uno de los compuestos sintetizados (8A) presenta una eficacia anticonvulsiva del 100 % en el modelo murino, mientras que en el modelo de embriotoxicidad se demuestra que dicho compuesto es menos tóxico que CBZ y VP para organismos en desarrollo. Finalmente, los biomarcadores de estrés oxidativo muestran que CBZ eleva el grado de lípidos oxidados, así como la actividad de la Gpx, lo que indica una mayor toxicidad respecto al compuesto 8A.

ABSTRACT

Epilepsy is the continued predisposition to show series of signs and symptoms, called seizures. This condition keeps the patient psychologically and socially limited due to poor acceptance of the disease. Epileptic condition is incurable, and the treatment is based in reducing episodes with drugs that inhibit the physiological and biochemical mechanisms that initiate a crisis. A family of drugs used are the benzodiazepines, which is chemically defined as heterocyclic compounds formed by the fusion of an aromatic ring and a 7-membered ring with two nitrogen atoms in position 1 and 4. These are lipophilic compounds, so readily cross the blood-brain barrier, thereby increasing its bioavailability, generating therapeutic effects at low doses. Recent studies show that molecules similar to these drugs have displayed biological activity, which opens a wide view in finding alternatives to existing therapies. Currently, the design of anticonvulsant drugs is a proposed of National Institutes of Health (NIH) in conjunction with the National Institute of Neurological Disorders in the Field of Epilepsy, where in first instance, the effect anticonvulsant is elucidated and later, the possible harmful effects of these compounds on the Central Nervous System are evaluated. Thus this project focused on assessing anticonvulsant efficacy of two heterocyclic compounds, 5*H*-dibenzo[*b,e*]azepin-6,11-dione (7A) and dibenzo(*b,f*)(1,4)diazocin-6,11(5*H*,12*H*)-dione (8A) in male mice of the CD1 strain. Subsequently, a first toxicological profile was performed by evaluation of embryotoxicity in a zebrafish model (*Danio rerio*) and quantifying the content of hydroperoxides (Hpx), lipoperoxidation level (LPX) and oxidized proteins (Pox) and the activity of catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX) in brain tissue of common carp (*Cyprinus carpio*). The results show that one of the synthesized compounds (8A) has an anticonvulsant efficacy of 100% in the mouse model, while the embryo model shows that the compound is less toxic than CBZ and VP for developing organisms. Finally, biomarkers of oxidative stress show that CBZ raises the degree of oxidized lipids as well as GPX activity, indicating greater toxicity to the compound 8A.

INTRODUCCIÓN

La epilepsia es una enfermedad crónica que afecta aproximadamente a 65 millones de personas alrededor del planeta (Thurman *et al.*, 2011), se presenta regularmente en niños, y es caracterizada por una serie de trastornos neurológicos donde se existen episodios repentinos de descargas eléctricas anormales y sincrónicas que pueden estar acompañados por pérdida de la conciencia, estos episodios son llamados crisis, y pueden involucrar al sistema motor (convulsiones), sensorial y autonómico (Panayiotopoulos, 2012). Esta condición puede no ocasionar incapacidad física, sin embargo, condicionan a limitaciones psicológicas y sociales que pueden deteriorar la condición del paciente, esto debido a la mala aceptación de las patologías por parte de la población, el propio rechazo y aislamiento del paciente, y el desconocimiento del desarrollo de nuevos fármacos que permitan al individuo tener un tratamiento eficaz de su condición (Figueroa Duarte & Campell Araujo, 2004; Rantanen *et al.*, 2012). En la actualidad existen diversas terapias para reducir el número de crisis presentadas por los pacientes; parte de estos tratamientos son los fármacos anticonvulsivos (FAC) que inhiben los mecanismos bioquímicos y electrofisiológicos por los cuales se desencadenan los signos y síntomas característicos de la enfermedad, siendo los de mayor prescripción en México el ácido valproico (VP), carbamazepina (CBZ) y benzodiacepinas como clonacepam (CLZ) (Martínez Juárez *et al.*, 2012); las benzodiacepinas son compuestos heterocíclicos formados por la fusión de un anillo bencénico y un anillo de 7 miembros, con dos átomos de nitrógeno en la posición 1 y 4, que potencian la acción inhibitoria de GABA al generar una mayor frecuencia de apertura del canal de cloro acoplado al receptor del ácido gamma aminobutírico de tipo A (γ GABA_A), disminuyendo o aboliendo los potenciales de acción. Esta característica de las benzodiacepinas hace de estos fármacos una opción en el tratamiento de las crisis convulsivas, sin embargo los efectos adversos que producen, tales como retardo psicomotor, deterioro de la memoria, desinhibición paradójica, depresión, tolerancia y dependencia fisiológica y psicológica, han limitado su uso en la práctica clínica (Longo, 2000). Alrededor del 30 % de los pacientes con epilepsia han experimentado experiencias fallidas con los tratamientos farmacológicos existentes, mientras otros han presentado efectos adversos al consumo de dicha medicación. Por lo anterior, se evaluó la toxicidad de una dibenzacepina (la 5H-dibenzo[b,e]azepin-6,11-diona, 7A) y una dibenzodiazocina (la dibenzo(b,f)(1,4)diazocin-6,11(5H,12H)-diona, 8A) con eficacia anticonvulsivante similar a las benzodiacepinas utilizadas actualmente en la clínica, generando con esto alternativas en el tratamiento de las crisis convulsivas.

JUSTIFICACIÓN

Aproximadamente el treinta por ciento de los pacientes con epilepsia experimentan resistencia a los tratamientos utilizados para el control de las crisis convulsivas; mientras que otros presentan efectos adversos al consumo de dicha medicación. Esto ha generado la necesidad de buscar compuestos que ejerzan una acción sobre el sistema nervioso central, que permitan después de ensayos preclínicos y clínicos, obtener tratamientos alternativos para el control de las crisis convulsivas. Como consecuencia, el diseño de moléculas con propiedades anticonvulsivantes consta de dos fases en su etapa preclínica, la primera relacionada a elucidar el potencial de un compuesto sobre el SNC, y la segunda donde se evalúan las propiedades toxicológicas de la molécula en estudio. En un proyecto previo, se logró la síntesis orgánica de dos compuestos heterocíclicos, la 5*H*-dibenzo[*b,e*]azepin-6,11-diona (7A) y la dibenzo(*b,f*)(1,4)diazocin-6,11(5*H*,12*H*)-diona (8A), evaluando el potencial anticonvulsivo en ratas macho de la cepa Wistar de uno de ellos (8A), obteniendo resultados favorables. Este proyecto se enfocó en evaluar la actividad anticonvulsivante de ambos compuestos utilizando un modelo de inducción química de convulsiones en ratón macho de la cepa CD1 y posterior determinación de la toxicidad de éstos a nivel embrionario y cerebral en modelos de vertebrados.

HIPÓTESIS

Los análogos de benzodiazepinas 7A y 8A tienen propiedades anticonvulsivantes en ratones macho de la cepa CD1.

Los análogos de benzodiazepinas 7A y 8A no tienen efectos tóxicos en dos modelos de vertebrados.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial anticonvulsivante y tóxico de los compuestos 7A y 8A.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar el potencial anticonvulsivo de los análogos de benzodiazepinas sintetizados mediante el modelo agudo de inducción química de convulsiones con pentilentetrazol en ratones macho de la cepa CD1.

Evaluar el posible efecto embriotóxico de carbamazepina, ácido valproico, clonacepam y los análogos de benzodiazepinas en embriones de pez cebra (*Dario rerio*).

Determinar el estrés oxidativo producido por la exposición a carbamazepina, ácido valproico y los análogos de benzodiazepinas con efecto anticonvulsivo en el cerebro de la carpa común (*Cyprinus carpio*).

CAPÍTULO I

MARCO DE REFERENCIA

1.1. Epilepsia

Es el nombre de un desorden cerebral caracterizado predominantemente por interrupciones recurrentes e impredecibles de la función cerebral normal y que se denominan crisis epilépticas. Una crisis epiléptica es un evento transitorio que implica una serie de signos y síntomas relacionados con una actividad cerebral con hipersincronía excesiva. La epidemiología es variable, algunos datos sugieren que 1 de cada 26 personas es diagnosticada con esta condición, además de generar un costo de 15.5 billones de dólares anuales englobando gastos médicos, pérdidas o reducción de ingresos y producción de capital (CDC, 2014; Fisher *et al.*, 2014).

Las crisis se pueden clasificar en crisis parciales y generalizadas, las primeras son aquellas en las que las manifestaciones clínicas y electroencefalográficas indican la activación de un área cerebral determinada, llamada “foco epiléptico”, las crisis parciales a su vez pueden dividirse en simples, donde no existe pérdida de la conciencia y las complejas donde se presenta una desconexión del medio exterior, movimientos involuntarios y amnesia posterior al episodio convulsivo (Fisher *et al.*, 2005).

Las crisis generalizadas son aquellas en que la activación cerebral ocurre en ambos hemisferios cerebrales provocando crisis que pueden ser de diversos tipos (Fisher *et al.*, 2005).

Crisis convulsivas tónicas: en las cuales existe pérdida brusca de la conciencia seguida de contracciones del tronco y las extremidades, el aire es forzado desde los pulmones hacia la laringe, algunas veces se presenta lagrimeo y presión de los dientes, son de duración breve por lo que puede o no presentarse confusión después de la crisis.

Crisis convulsivas clónicas: consiste en movimientos violentos de los miembros que gradualmente van desapareciendo en frecuencia, la lengua y los labios pueden ser mordidos, la relajación de esfínteres en combinación con las contracciones de la musculatura abdominal produce incontinencia urinaria. La fase clónica dura, en promedio, 2 a 3 minutos y es seguido por una relajación completa de los músculos. Al terminar el

episodio convulsivo la persona queda desorientada y presenta amnesia del lapso de tiempo en que ocurrió la crisis.

Crisis convulsivas mioclónicas: son caracterizadas por una sacudida brusca, muy rápida y generalizada de las cuatro extremidades, dura escasos segundos, pero puede haber pérdida de la postura debido a que pueden afectar la musculatura del cuello y del tronco.

Crisis acinéicas: producen pérdida súbita del tono muscular y de la conciencia durante un segundo o menos, por lo que hay caída al suelo, estas crisis son cortas pero muy riesgosas en sentido de los traumas que pueden generarse en la caída.

Crisis de ausencia: se produce una interrupción repentina de la conciencia, se caracteriza por una mirada fija e inexpressiva, terminan bruscamente, reanudando la actividad previa, son de corta duración, de entre 5 y 20 segundos, literalmente es una desconexión del medio exterior, sin pérdida de la postura.

Crisis convulsivas tónico-clónicas: en las cuales se presentan síntomas vagos seguidos de una pérdida brusca de la conciencia, rigidez en las extremidades (fase tónica), sacudidas rítmicas en los brazos y piernas (fase clónica), puede presentarse mordedura de la lengua, labios morados, salida de “espuma” por la boca, y relajación de esfínteres. Al terminar el episodio convulsivo el paciente entrara en un sueño profundo (de minutos a horas dependiendo la intensidad de la crisis) y despertara mareado, confundido, desorientado con amnesia del lapso de tiempo de la convulsión, cansado y con cefalea (Engel, 2006).

Status epilepticus: Este es un tipo particular de actividad epiléptica con la aparición de crisis de larga duración, de más de 30 minutos, o la aparición de varias crisis en forma sucesiva en las cuales no existe recuperación de la conciencia entre una y otra.

La actividad epiléptica es producida por una hipersincronía neuronal focal que puede llegar a propagarse involucrando ambos hemisferios cerebrales ya sea por anomalías de tipo biológico o físico en la célula o por una transmisión sináptica desordenada, que favorecen a la formación del foco epileptogénico o epileptogénesis, es decir, el proceso por el cual un grupo de neuronas normales cambian sus funciones al punto de volverse hiperexcitables produciendo crisis espontáneas. Aunado a esto, el origen de la epileptogénesis puede diferenciarse en genético en donde la mayor parte de las disfunciones son adjudicadas a canalopatías que afectan a genes relacionados con la

estructura-función de canales iónicos dependientes de voltaje o asociados a receptores de neurotransmisores y adquirido en donde situaciones ajenas al propio individuo como hemorragias cerebrales, traumatismos, meningoencefalitis o tumores determinan su predisposición a presentar crisis (Bromfield *et al.*, 2006; Engel, 2006).

En condiciones normales el potencial de acción se inicia con la apertura de los canales de Na^+ seguido de despolarización y apertura de los canales de Ca^{2+} , el calcio se acopla a las proteínas fijadoras de calcio en el citosol y es secuestrado en la mitocondria para evitar una concentración excesiva que pudiera llegar a ser citotóxica, por último se abren los canales de K^+ , que repolarizan a la célula para que pueda haber una nueva despolarización (Bromfield *et al.*, 2006).

En la epilepsia, las neuronas son capaces de producir cambios paroxísticos de despolarización (PDS por sus siglas en inglés), que inician con cambios en la permeabilidad de la membrana neuronal seguido de una serie de potenciales de acción de alta frecuencia generando una despolarización mantenida hasta que la neurona compensa con una hiperpolarización para después alcanzar un potencial de reposo. El inicio de la descarga se atribuye a la activación de canales de sodio acoplados a receptores glutamatérgicos de tipo AMPA y KA que permiten una entrada rápida de sodio despolarizando la membrana, la despolarización mantenida y las descargas de alta frecuencia es atribuido a la estimulación de receptores a glutamato del tipo NMDA, que permiten la entrada de calcio de manera lenta a la célula asociada a corrientes de calcio dependientes de voltaje. La hiperpolarización está mediada por un componente de respuesta rápida por activación de canales de cloro acoplados a receptores GABA_A y mecanismo lento mediado por la activación de canales de potasio dependientes de voltaje y asociados a receptores GABA_B , que limita la extensión de la descarga. Una neurona o grupo de neuronas desincronizadas no son capaces de producir alteraciones, para producir la despolarización sostenida se necesita que varias células tengan PDS de forma sincrónica, para después amplificarse lo suficiente para generar una crisis (Ayala *et al.*, 1973; Bromfield *et al.*, 2006).

1.2. Sistema GABAérgico.

El ácido γ -amino butírico (GABA) es uno de los neurotransmisores más importantes entre los mamíferos de amplia distribución a lo largo de la neuraxis. A pesar de que este neurotransmisor se encuentra en regiones periféricas del organismo y que regula

funciones del intestino, pulmones y vejiga, su principal acción es ejercida en el sistema nervioso central. La respuesta que genera GABA en el sistema nervioso es hiperpolarización, dando respuestas inhibitorias, esto aunado a la cantidad de neuronas GABAérgicas hace de este aminoácido el neurotransmisor inhibitorio por excelencia (Chupakhin *et al.*, 2006). Molecular y farmacológicamente se tienen identificados tres tipos de receptores GABA:

GABA_A es un pentámero que puede estar formado por la combinación de los productos de 19 genes que codifican para 8 subunidades (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , ϵ , θ , π , ρ_{1-3}), dando diversas combinaciones y complejos moleculares, sin embargo, algunos estudios demuestran que no todos responden a GABA, por lo que se estima que el número de receptores GABA_A funcionales en el SNC es menor a 100. Por otro lado, el GABA_B es un receptor metabotrópico acoplado a proteínas G, este receptor está implicado en mecanismos de autorregulación del neurotransmisor al disminuir su liberación hacia el espacio sináptico. Mientras que el receptor GABA_C es de tipo ionotrópico conformado por la unión de 5 subunidades ρ localizados en la retina, sensibles al GABA pero sin modulación ante la presencia de benzodiacepinas, bicuculina, barbitúricos o neuroesteroides (Bowery *et al.*, 1981; Bormann, 2000; Adkins *et al.*, 2001).

Generalmente la activación del receptor GABA_A produce un influjo de iones cloro a la célula provocando una hiperpolarización, sin embargo bajo ciertas circunstancias en regiones específicas del hipocampo y ganglios de la raíz dorsal se presenta despolarización, debido a que la concentración de cloro intracelular excede los niveles extracelulares dejando abierto el canal, provocando un eflujo neto de este ion y por ende una excitación neuronal. Dentro del grupo de fármacos que actúan directamente sobre el receptor GABA_A, teniendo acción de modulador positivo, se encuentran los barbitúricos y las benzodiacepinas, que son utilizados como ansiolíticos, hipnóticos, anticonvulsivantes y anestésicos (Figura 1).

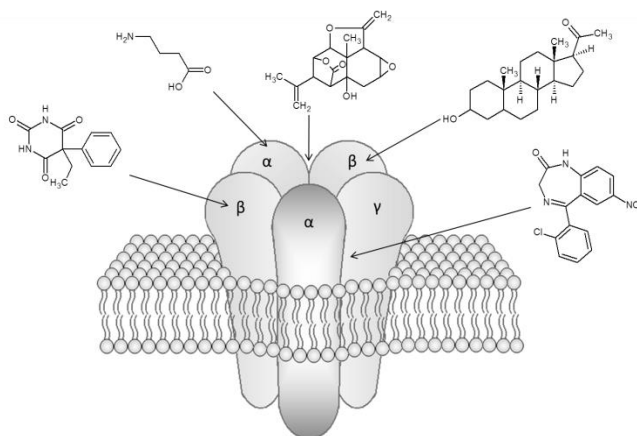


Figura 1. Esquema que muestra los sitios de interacción de ciertas sustancias químicas sobre el receptor GABA_A (Medel Matus *et al.*, 2011)

Sin embargo, estudios asociados a la delección de genes y mutaciones indican que alteraciones en las subunidades de GABA_A pueden influir de manera crítica en el umbral de las crisis sugiriendo que estos cambios pueden ser responsables de algunas formas de epilepsia, teniendo en cuenta que la utilidad de las benzodiazepinas es limitada, debido a la poca efectividad que muestran ante estos cambios estructurales del receptor, así el clonacepam es usado generalmente en crisis de ausencia y mioclónicas, el clorazepato es usado como terapia adjunta para el tratamiento de crisis parciales complejas mientras fármacos como el diacepam y loracepam por vía intravenosa son utilizados para terminar el *status epilepticus*. Por lo anterior, se puede observar como la variabilidad de la estructura del receptor genera que no todas las benzodiazepinas tengan el mismo potencial para tratar las crisis epilépticas (Scimemi *et al.*, 2005; Medel Matus *et al.*, 2011).

Un gran grupo de receptores de este tipo poseen una combinación de las subunidades α_1 o α_2 , γ_2 y β_2 . Estas combinaciones de las subunidades determina las propiedades farmacológicas y biofísicas de estos sitios, por ejemplo la combinación α_1 o $\alpha_2\gamma_2\beta$ designadas como receptores GABA A1a y A2a respectivamente responde a benzodiazepinas, hipnóticos y ansiolíticos no benzodiazepínicos, sin embargo receptores sin la subunidad γ por ejemplo $\alpha_1\beta_x\epsilon$ o combinaciones de γ con α_4 o α_6 generalmente son insensibles a benzodiazepinas y fármacos relacionados (Hanson *et al.*, 2008).

1.3. Benzodiacepinas

Son compuestos heterocíclicos que tienen efecto hipnótico, ansiolítico, anticonvulsivante, amnésico y miorrelajante. Pertenecen a la familia de los psicotrópicos, actuando como depresores del sistema nervioso central. Actualmente las benzodiacepinas son utilizadas en el tratamiento de desórdenes mentales como episodios maniacos, insomnio, epilepsia, tratamiento del alcoholismo y espasmos musculares. La primera benzodiacepina sintética fue el clordiazepóxido, descubierta por Sternbach en 1954 y sintetizada posteriormente por los Laboratorios Roche para su comercialización. Este compuesto posteriormente fue desplazado por una estructura más sencilla llamada diazepam, que es utilizado ampliamente para tratar trastornos relacionados con insomnio y estrés (McKernan *et al.*, 2000; Cooper & Roth, 2003; Bulach *et al.*, 2005).

1.4. Farmacocinética de las benzodiacepinas

La mayoría de las benzodiacepinas se absorben por completo, la mejor vía de administración para estos fármacos es la oral debido a su alta liposolubilidad, excepto el loracepam que se absorbe completamente por vía intramuscular por su carácter ácido, el tiempo medio de absorción es variable entre las mismas benzodiacepinas, así el midazolam tienen un tiempo de absorción de 30 minutos siendo la benzodiacepina más liposoluble, caso contrario es el flunitracepam, la benzodiacepina más hidrosoluble, que tiene un tiempo medio de absorción de 3 horas (Mecoloni *et al.*, 2008). La velocidad de distribución de la benzodiacepinas en el organismo es de entre 1 y 3 L/kg. Tienen un alto grado de fijación a proteínas plasmáticas y debido a su alta liposolubilidad atraviesan fácilmente barrera hematoencefálica y placenta, además se ha detectado la presencia de benzodiacepinas en leche materna. Las benzodiacepinas son biotransformadas en el hígado mediante el sistema enzimático citocromo P₄₅₀, y tienen dos vías metabólicas, la oxidación microsomal (fase I) y la glucoronoconjugación (fase II), no todas las benzodiacepinas siguen las dos fases de la biotransformación, las benzodiacepinas que contienen grupos hidroxilo en su estructura pasan directamente a la fase II, mientras que las otras benzodiacepinas primero pasan por la fase I para conjugarse en la fase II, a excepción del clonacepam que tiene una biotransformación diferente, por reducción del grupo 7-NO₂ a la amina correspondiente seguido de una acetilamina. La excreción de las benzodiacepinas es mayoritariamente por vía renal, por arriba del 60 %, seguido de la vía intestinal (Cresta, 2001).

1.5. Interacción de las benzodiazepinas y el receptor GABA_A

Generalmente la activación del receptor GABA_A produce un influjo de iones Cl⁻ a la célula provocando una hiperpolarización, sin embargo bajo ciertas circunstancias en regiones específicas del hipocampo y ganglios de la raíz dorsal se presenta despolarización, debido a que la concentración de cloro intracelular excede los niveles extracelulares dejando abierto el canal provocando un eflujo neto de este ion y por ende una excitación neuronal. Dentro del grupo de fármacos que actúan directamente sobre el receptor GABA_A, teniendo acción de modulador positivo, se encuentran las benzodiazepinas, que son utilizadas como ansiolíticos, hipnóticos, anticonvulsivantes y anestésicos. Las distintas funciones que muestran estos compuestos se debe a los subtipos de receptores GABA_A presentes en el SNC, por ejemplo diazepam y clordiazepóxido son utilizados en el tratamiento de la ansiedad, mientras que otras benzodiazepinas como el flurazepam, alprazolam y triazolam y compuestos no benzodiazepínicos como zolpidem son usados como hipnóticos. Los barbitúricos también son de elección para este tipo de desórdenes pero se prefieren las benzodiazepinas y el zolpidem por tener un margen mayor de seguridad. Algunos barbitúricos como el fenobarbital y benzodiazepinas como clorazepato y clonazepam son usados en el tratamiento de crisis convulsivas (Enna & Coyle, 1998; Enna & Möhler, 2007).

1.6. Análogos de benzodiazepinas con potencial actividad biológica

En el caso específico de la síntesis de benzodiazepinas, estas pueden ser obtenidas a partir de un anillo aromático con una ramificación que incluya grupos amino, obteniendo un compuesto heterocíclico con actividad biológica sobre el sistema nervioso central (Focella & Rachlin, 1967; Graham Solomons, 2004; Proust *et al.*, 2009; Smith, 2011). En el desarrollo de nuevas moléculas las variaciones estructurales se realizan con la intención de potenciar un efecto biológico en primera instancia. Se han desarrollado compuestos análogos que han demostrado tener actividad sobre sistemas vivos. Estructuralmente las benzodiazepinas son moléculas heterociclos que contienen nitrógeno en su estructura, por lo que sus análogos tienen versatilidad para actuar como agonistas del receptor periférico a colecistoquinina, inhibidores de la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y por supuesto ejercer un efecto sobre el sistema nervioso central, específicamente sobre el sistema GABAérgico (Migliara *et al.*, 2004, 2012; Araújo *et al.*, 2008).

Estudios previos elaborados en nuestro grupo de investigación, permitieron diseñar una serie de compuestos análogos, específicamente dibenzacepin-2,5-dionas y dibenzodiazocin-6,11-dionas (Figura 2), que posteriormente fueron evaluados mediante técnicas computacionales de acoplamiento molecular (*docking*), determinando así la afinidad teórica de los compuestos con la estructura tridimensional del receptor GABA_{Aα1}. Posteriormente se sintetizaron y caracterizaron dos compuestos, la 5H-dibenzo(b,e)azepin-6,11-diona (7A) y la dibenzo(b,f)(1,4)diazocin-6,11(5H,12H)-diona (8A), evaluando la actividad anticonvulsiva de este último en pruebas preliminares en ratas Wistar, teniendo efectos similares al clonacepam (Gasca *et al.*, 2010; Saavedra-Vélez *et al.*, 2014).

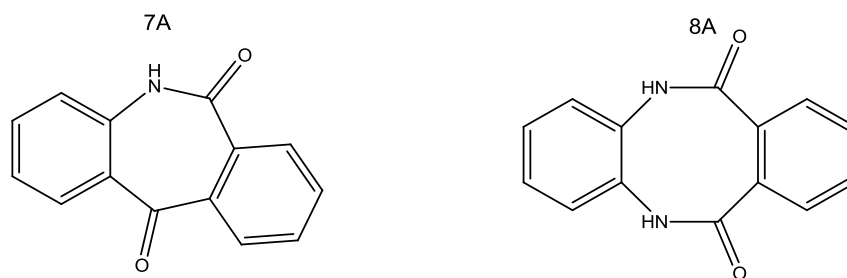


Figura 2. Estructura de los análogos de benzodiacepinas: 5H-dibenzo(b,e)azepin-6,11-diona (7A) y dibenzo(b,f)(1,4)diazocin-6,11(5H,12H)-diona (8A).

1.7. Toxicidad inducida por fármacos: el caso específico de las benzodiacepinas

Es sabido que ciertos fármacos tienden a reflejar en el individuo condiciones fisiopatológicas características, y que esto afecta a distintos órganos, involucrados en la absorción, biotransformación y eliminación de estos (Devlyn, 2008). Las benzodiacepinas han sido relacionadas a toxicidad aguda en sobredosis combinadas con etanol o por diferencias polimórficas en el complejo de enzimas hepáticas citocrómicas (CYP₄₅₀) de cada paciente, generando hepatocitotoxicidad en la mayoría de las situaciones mencionadas (Nordt & Clark; Imler *et al.*, 1987; Höjer *et al.*, 1989; Andrade *et al.*, 2000; Fukasawa *et al.*, 2007). Por otra parte, la neurotoxicidad de las benzodiacepinas ha sido comprobada, tanto en el desarrollo del SNC de vertebrados, como en animales adultos que tienen sus sistemas de neurotransmisión completamente desarrollados y funcionales. Un ejemplo de esto es el diacepam, que presenta potencial teratógeno en humanos expuestos en fase prenatal causando malformaciones craneofaciales, así como labio y paladar hendido (Swaab *et al.*, 1988). Los neonatos de madres que fueron tratadas con

benzodiazepinas en el embarazo presentan hipotonía, bajas puntuaciones de Apgar y depresión respiratoria. Laegreid et. al. a finales de los ochenta describió características dismórficas, aberraciones del crecimiento y anomalías del sistema nervioso central en niños expuestos a benzodiazepinas *in utero*, además de presentar diversos desórdenes mentales, incluyendo hiperactividad, déficit de atención y percepción visual gravemente perturbada (Laegreid et al., 1989; Karkos, 1991; Mantovani & Calamandrei, 2001; Devlin & Henry, 2008). Por lo anterior, es de vital importancia determinar la toxicidad de compuestos análogos de benzodiazepinas a nivel neurológico ya que si bien se ha comprobado una eficacia similar a las benzodiazepinas comerciales, se debe determinar el riesgo toxicológico de la administración de estos compuestos en modelos animales.

1.8. Programa de Desarrollo de Drogas Anticonvulsivantes (ADD)

Este es un programa desarrollado por Institutos Nacionales de Salud (NIH por sus siglas en inglés) en conjunto con el Instituto Nacional de Desórdenes Neurológicos en el Ramo de la Epilepsia, que desde 1975 ha permitido desarrollar en colaboración con la industria farmacéutica nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de las crisis convulsivas, ante la necesidad de generar alternativas a los fármacos ya existentes, debido a las experiencias fallidas de los pacientes, ya sea por resistencia o por las reacciones adversas. Este programa permitió en 1993 la salida al mercado en Estados Unidos del primer fármaco diseñado bajo este esquema, el felbamato. Siguieron a este el topiramato y la remacemida, de los cuales el primero fue aprobado en 1995 por el Reino Unido para su comercialización. En la actualidad, existe una gran lista de compuestos que siguen en la fase de desarrollo clínico temprano (Stables & Kupferberg, 1997; ILAE, 2012; NIH, 2014).

Anualmente este programa evalúa aproximadamente 800 compuestos utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*. Estos modelos forman parte de ensayos preclínicos que permiten en una primera etapa elucidar el potencial anticonvulsivante de una molécula y posteriormente evaluar la neurotoxicidad. Respecto a esta última, cuando inició el ADD solo se utilizaba el modelo del rodillo rotatorio para evaluar en ratones o ratas la neurotoxicidad inducida por la administración del fármaco, sin embargo, hoy en día este tipo de evaluación se complementa con modelos que permiten observar la neurotoxicidad a nivel celular identificando variables como la inducción de estrés oxidativo, necrosis o apoptosis y el potencial teratogénico de los compuestos en evaluación (Stables & Kupferberg, 1997; ILAE, 2012; NIH, 2014).

CAPÍTULO II

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICONVULSIVA EN UN MODELO MURINO

2.1. Antecedentes

2.1.1. Modelos de inducción de crisis convulsivas

Los modelos animales reproducen parcialmente la sintomatología de enfermedades que afectan al hombre con la finalidad de identificar los mecanismos implicados y evaluar nuevas estrategias terapéuticas. Los modelos animales en los que se inducen crisis convulsivas han ayudado a la investigación de nuevos fármacos con efectos anticonvulsivantes y su toxicidad en el organismo tras su administración tanto a corto como a largo plazo. Estos estudios también sirven para observar el mecanismo de acción de fármacos conocidos (Mas Bagà, 2006; Ramos-Morales *et al.*, 2012).

El primer estudio para observar el potencial terapéutico de un fármaco se realizó en la década de los años cuarenta, evaluando la actividad anticonvulsivante de la fenitoína en gatos, comprobando que incrementaba el umbral de la crisis de 12 a 50 mA (Merrit & Putnam, 1938).

En la actualidad los modelos animales relacionados con epilepsia o crisis incluyen los modelos de crisis agudas que juegan un papel importante en la búsqueda de mecanismos celulares o moleculares relacionados con la generación y terminación de las crisis, para la inducción de estas crisis se emplean choques eléctricos o drogas con potencial convulsivante para la inducción de la sintomatología. Los modelos crónicos de epilepsia se utilizan para entender los mecanismos de la epilepsia investigando anomalías persistentes entre crisis, ofreciendo un gran número de mecanismos potencialmente importantes y clínicamente relevantes, incluyendo excitotoxicidad y reorganización sináptica, anomalías en el funcionamiento de canales dependientes de voltaje, entre otros. Por otra parte existen modelos considerados como multifactoriales, donde principalmente se investiga la presencia de epilepsia secundaria a enfermedades por predisposición genética o daño específico (Engel & Pedley, 1997; Pitkänen *et al.*, 2006).

Dentro de los modelos de inducción de crisis agudas más utilizados se encuentra la inducción química por pentilentetrazol (PTZ), un proconvulsivante introducido en 1928, con este modelo se pueden evaluar las convulsiones clónico-tónicas, ya que son muy similares a las que se presentan en humanos. El modelo de inducción química con pentilentetrazol es ampliamente utilizado en el descubrimiento de la actividad

anticonvulsivante de nuevos fármacos debido a que se busca que dichas moléculas funcionen como antagonistas del convulsivante. También ha sido utilizado en diversos estudios en los que se han evaluado el efecto sobre el sistema nervioso central de extractos de plantas como anticonvulsivos. Sin embargo, este modelo no permite diferenciar los fármacos efectivos en las crisis tónico-clónicas y las crisis de ausencia (Engel, 1997). Por lo tanto el modelo del pentilentrazol se considera adecuado para evaluar la actividad anticonvulsivante de compuestos de nueva síntesis (Ariza *et al.*, 2006; Mas Bagà, 2006; Ramos-Morales *et al.*, 2012).

2.2. Metodología

2.2.1. Evaluación anticonvulsivante de los compuestos sintetizados.

Los compuestos purificados mediante cristalización y caracterizados por técnicas espectroscópicas, fueron probados en modelos animales, utilizando como sujetos de estudio ratones macho de la cepa CD1. La evaluación anticonvulsivante se realizó mediante el modelo agudo de inducción química de convulsiones con pentilentetrazol de la siguiente manera: Se utilizaron ratones macho de la cepa CD1 con un peso de 15 a 25 g, que fueron mantenidos en ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas. Los animales (N= 40) fueron alojados en un bioterio en cajas de acrílico transparente con libre acceso a agua y alimento. Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en 7 grupos, uno recibió vehículo, dos recibieron dosis correspondientes del compuesto 7A (15.83 μ mol y 22.4 μ mol), dos fueron tratados con diferentes dosis del compuesto 8A (15.83 μ mol y 20.9 μ mol), los últimos grupos fueron utilizados como controles farmacológicos (15.83 μ mol de CLZ y 84.64 μ mol de CBZ). Las soluciones fueron preparadas de manera que cada individuo recibió 2 mL/Kg. La administración se realizó por vía oral. Los animales de cada grupo fueron colocados individualmente en cajas de acrílico por 1 hora antes de la administración del PTZ. Se utilizó este último en administración única por vía intraperitoneal (50 mg/mL/Kg) para inducir las convulsiones, usando como vehículo solución de NaCl al 0.9 %. La duración de la prueba conductual fue de 1800 segundos a partir de la administración del PTZ. Las variables evaluadas fueron latencia a la convulsión (tiempo transcurrido desde la administración del PTZ hasta el inicio de la convulsión), duración de la convulsión (segundos) y el tiempo de recuperación (segundos). Así como la confrontación de datos de los animales que presentaron o no las crisis contra el tratamiento utilizado, como se muestra en la Figura 6 (Cresta, 2001; Pirnay *et al.*, 2008; Bhat & Al-Omar, 2011). Es importante mencionar que todos los animales fueron manipulados de acuerdo a las normas éticas internacionales y pasadas 24 horas de la prueba fueron sacrificados por una sobredosis de pentobarbital sódico (IRAC, 1985; NOM-062-ZOO, 1999).

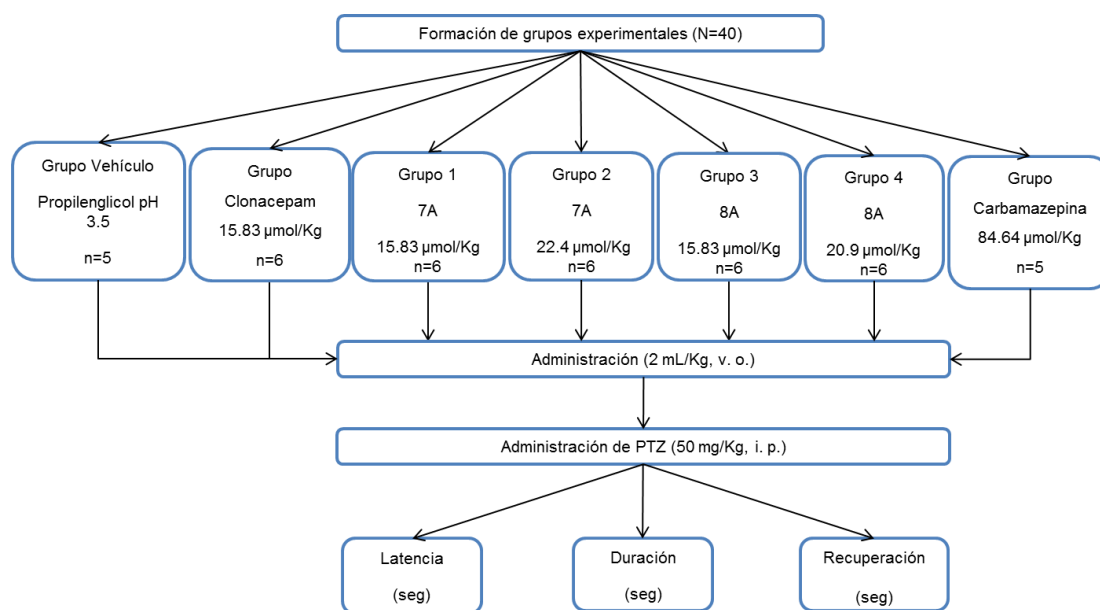


Figura 3. Esquema de la distribución de grupos experimentales para la evaluación del potencial anticonvulsivo de los compuestos sintetizados en ratones macho de la cepa CD1.

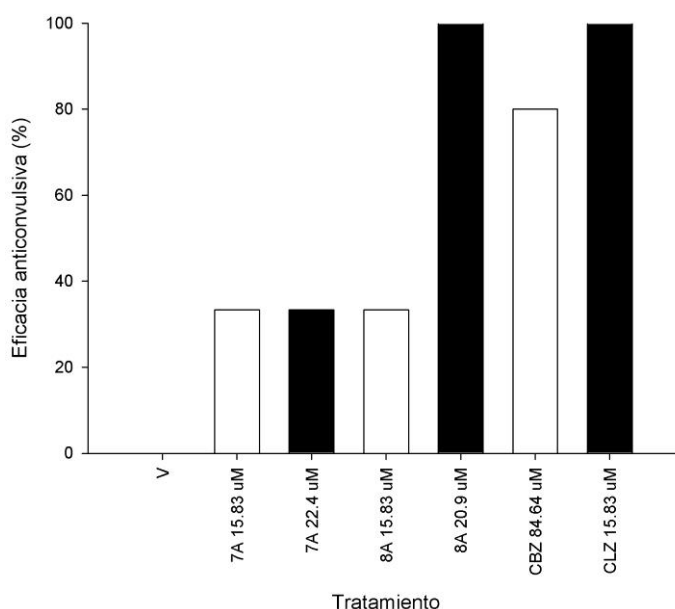
2.3. Análisis estadístico

Para la evaluación del potencial anticonvulsivo en ratones en la variable de latencia se utilizó una ANOVA de una vía paramétrica para grupos independientes. Para las variables de duración de la crisis convulsiva y recuperación se utilizó una ANOVA de una vía utilizando un modelo lineal generalizado con una distribución *poisson* con sobre dispersión, debido a la existencia de ceros en la base de datos; cuando $p < 0.05$ se utilizó un análisis de comparaciones múltiples para observar diferencias entre los grupos. Los paquetes estadísticos manejados fueron STATISTICA 7, JMP 6 y SIGMA PLOT 10.0.

2.4. Resultados

2.4.1. Potencial anticonvulsivo de los compuestos sintetizados

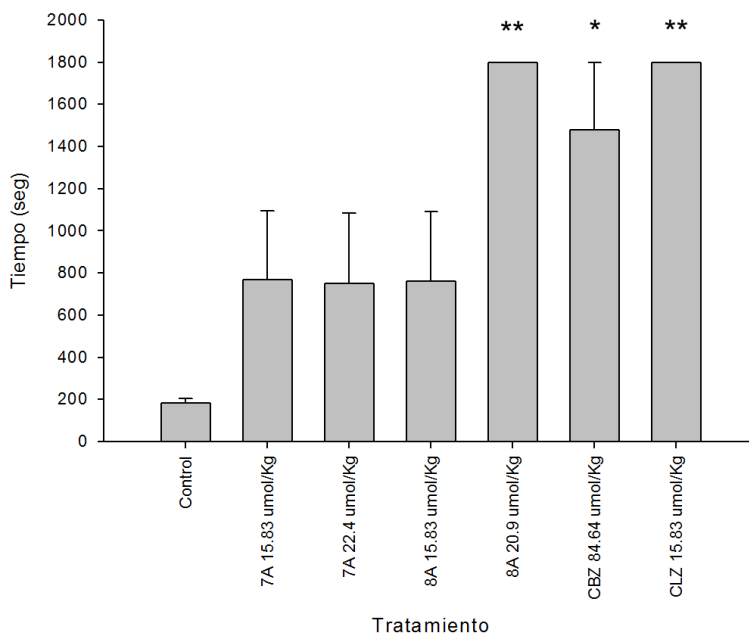
Se presentan en la Gráfica 1 los datos correspondientes a la eficacia anticonvulsivante de los compuestos en sus diferentes dosis con respecto al V, CBZ y CLZ, donde se observa que el vehículo no presenta un efecto protector ante la posterior administración de PTZ. En el mismo contexto, es de hacer notar que la eficacia anticonvulsiva 8A en su concentración más baja (15.83 μmol) tienen una eficacia del 33.33 %. Ante esto, la carbamacepina presentó una eficacia del 80 % al compararlos con clonacepam y el compuesto 8A en una concentración de 22.4 μmol , que brindan una protección del 100 % a la inducción de la crisis convulsiva con PTZ.



Gráfica 1. Eficacia anticonvulsiva de los controles farmacológicos (CBZ, CLZ) y de los compuestos sintetizados con respecto a vehículo en porcentaje.

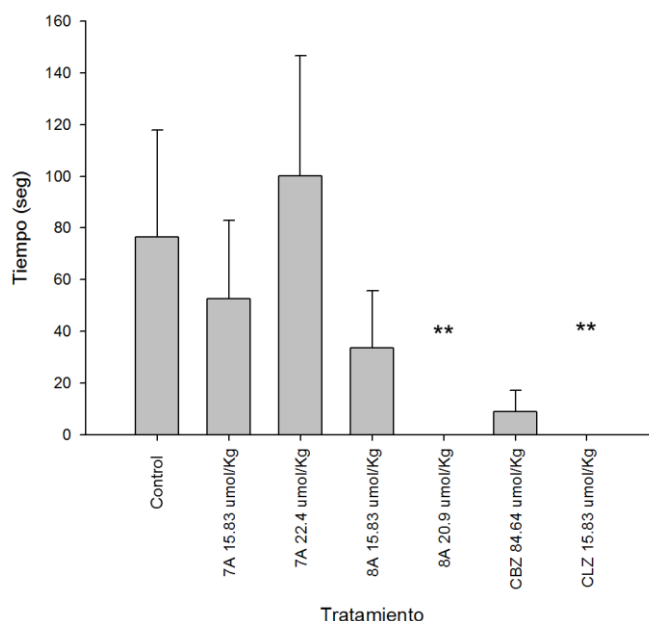
Posterior al ANOVA, se obtuvieron los datos correspondientes a la latencia a la aparición de la crisis convulsiva después de la administración del PTZ. En la Gráfica 2, se puede observar que existen diferencias significativas entre los grupos ($F_{(6, 0.05)}=5.90$, $p<0.001$), por lo que se realizaron las comparaciones múltiples entre los grupos. Se observa que CLZ y 8A 20.9 μmol presentan diferencias marcadas con respecto al control al

incrementar la latencia a la crisis convulsiva hasta el tiempo final de la prueba (1800 s, $p < 0.001$).



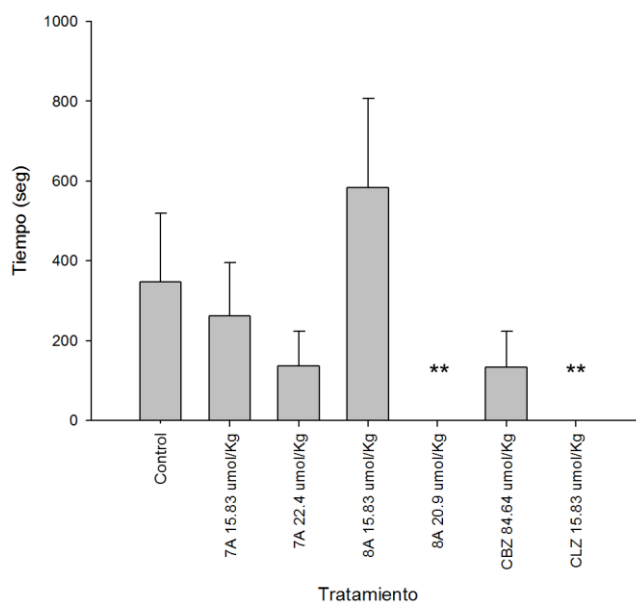
Gráfica 2. Efecto de los compuestos sintetizados sobre la latencia a las convulsiones inducidas por PTZ en ratones macho CD1. Cada barra representa la media $\pm$ E. E. valores para $n = 6$ ratones por tratamiento. * $p < 0.01$ vs Control; ** $p < 0.001$ vs Control.

En relación a la variable correspondiente a la duración de la crisis convulsiva (Gráfica 3), el análisis de varianza muestra diferencias entre los grupos ($\chi^2_{(6, 0.05)} = 27.3$, $p < 0.001$), 8A 20.9 μmol , CLZ y CBZ, que presentan la mayor eficacia anticonvulsivante ($p < 0.001$), ya que reducen la duración de las crisis.



Gráfica 3. Efecto de los compuestos sintetizados sobre la duración de las convulsiones inducidas por PTZ en ratones macho CD1. Los valores son representados como la mediana $\pm$ I. C. valores para n= 6 ratones por tratamiento. **Efecto significativo ($p<0.001$) comparado con el grupo Control.

Finalmente, para la variable de recuperación a la crisis, se muestra en la Gráfica 4, que solo aquellos grupos que no presentaron un episodio convulsivo (CLZ y 8A 20.9 μ mol) presentan diferencias significativas ($p<0.001$), comparadas con el control.



Grafica 4. Efecto de los compuestos sintetizados sobre la recuperación de las convulsiones inducidas por PTZ en ratones macho CD1. Los valores son representados como la mediana $\pm$ I. C. Valores para $n=6$ ratones por dosis. **Efecto significativo ($p<0.001$) comparado con el grupo control.

2.5. Discusión

Al comparar nuestros resultados con los obtenidos en un estudio previo, donde se elucidó el potencial anticonvulsivo del compuesto 8A en ratas macho de la cepa Wistar, se observó que dicho compuesto tuvo efecto anticonvulsivo, con una eficacia similar a CLZ, de la misma forma que en nuestro ensayo (Gasca *et al.*, 2010; Saavedra-Vélez *et al.*, 2014). En ambos estudios se utilizó una benzodiacepina, CLZ, como control farmacológico, debido a que, de acuerdo al acoplamiento molecular 7A y 8A poseen afinidad por el receptor GABA alfa1/gamma2. En trabajos similares, donde se ha elucidado el potencial anticonvulsivo de compuestos heterocíclicos, utilizando el modelo PTZ, se ha demostrado que las moléculas que tienen la capacidad de abolir las crisis inducidas por este fármaco, tienen un mecanismo de acción relacionado a la modulación del sistema GABAérgico (Deng *et al.*, 2010, 2011; Piao *et al.*, 2011; Shu *et al.*, 2013).

El grupo amida (R_1 -CO-NH- R_2) se relaciona con un amplio espectro de actividades biológicas, que van desde antimicrobianos hasta anticonvulsivos; cuando a dicho grupo funcional se adhieren grupos fenilos, estos confieren mayor actividad biológica (Kushwaha *et al.*, 2011; Strupińska *et al.*, 2013). Las moléculas utilizadas en este estudio son un ejemplo claro de este tipo de compuestos, ya que presentan, en el caso de 7A, un grupo amida unido a dos anillos aromáticos, formando una estructura tridimensional heterocíclica de 7 miembros con amplia superficie de interacción, como lo demuestra el estudio teórico sobre el receptor GABA_A (Saavedra-Vélez *et al.*, 2014). Sin embargo, la eficacia anticonvulsiva de 7A es menor en las dos dosis utilizadas en el experimento, tomando como referencia a CBZ, CLZ y 8A, dado que solo aumenta el tiempo de latencia para la iniciación de la crisis convulsiva. Esto puede estar relacionado a que la dosis máxima utilizada (22.4 μ mol/Kg), corresponde a 5 mg/Kg, siendo insuficiente para generar un efecto biológico esperado. Estudios con otra serie de benzacepinas indican que la dosis mínima para generar un efecto anticonvulsivante en ratones de la cepa KungMing utilizando el modelo PTZ es de 45.6 mg/Kg, es decir, por lo menos nueve veces más a la dosis utilizada en este diseño experimental (Deng *et al.*, 2010).

En el compuesto 8A, se observan dos grupos amida unidos a dos anillos aromáticos, formando una estructura central de 8 miembros. Estudios previos mencionan la utilidad de las 1,5-benzodiazocinas, como antivirales, reductores del colesterol, reguladores de la actividad hormonal y depresores del SNC (Duncan *et al.*, 1965; Migliara *et al.*, 2004; Pettersson *et al.*, 2013). La molécula utilizada en este estudio es una 1,4-diazocina que

presenta una eficacia anticonvulsiva similar a la presentada por CLZ y mayor a CBZ. En el estudio teórico realizado a 8A y CLZ, se comprobó que ambas estructuras comparten sitios de interacción entre la subunidad $\alpha 1$ (Tir₁₆₀, Val₁₀₈, Gli₁₀₄, Fen₁₀₀, Fen₁₀₁) y $\gamma 2$ (Arg₁₄₄, Pro₁₂₇, Tir₁₂₆) del receptor GABA_A y de manera experimental, ambos compuestos presentan una eficacia anticonvulsiva a dosis de 5 mg/Kg en ratas macho de la cepa Wistar (Gasca *et al.*, 2010; Saavedra-Vélez *et al.*, 2014), por lo que, en este estudio se comprueba dicho efecto anticonvulsivo, utilizando ratones CD1. Finalmente, en este trabajo se corroboraron las predicciones realizadas mediante herramientas de la química computacional, en el diseño de compuestos con posibles efectos biológicos.

CAPÍTULO III

EVALUACIÓN DE LA EMBRIOTOXICIDAD EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA

3.1. Antecedentes

3.1.1. Pez cebra (*Danio rerio*)

Este es un organismo acuático tropical, perteneciente a la familia *Cyprinidae*, recibe su nombre común de las rayas azules horizontales a lo largo de su cuerpo y que se extienden hasta el final de la cauda. Tiene un cuerpo fusiforme y lateralmente estrecho, además de una quijada dirigida hacia la porción ventral del organismo. Presentan ligeras características de dimorfismo sexual; los machos son estrechos y presentan bandas doradas entre las líneas azules mientras que las hembras son de mayor tamaño con líneas de una tonalidad plata, además de que las hembras adultas poseen una pequeña papila genital en el origen de la aleta anal. En cautiverio, estos animales llegan a medir entre 5 y 7 cm y su vida media es de 2 a 3 años, aunque en condiciones ideales pueden llegar hasta los 5 años (Mayden *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2008; Spence *et al.*, 2008).

El pez cebra fue introducido como modelo animal a principios de los setentas por George Streisinger, quien utilizó larvas para desarrollar el primer ensayo en vertebrados que permitió generar avances genéticos, iniciando así una serie de investigaciones sobre el desarrollo de órganos. Los resultados de estas investigaciones derivaron en la caracterización de un gran número de genes involucrados en rutas del desarrollo de vertebrados, lo que lo estableció como un modelo relevante para enfermedades humanas e investigación farmacéutica (Hill *et al.*, 2005; Barros *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010).

3.1.2. *Danio rerio* como modelo de embriotoxicidad

Los modelos desarrollados en *Danio rerio* se caracterizan por generar resultados rápidos y reproducibles a bajos costos, lo que hace de ellos organismos de elección para pruebas preliminares de toxicidad. Esto se debe, en un primer término, al tamaño pequeño del animal lo que reduce costos de alimentación y alojamiento, así como la cantidad de residuos producidos. Por otra parte, el desarrollo del pez cebra es mucho más rápido que el de otros vertebrados y mamíferos, ya que en una semana los embriones de esta especie tienen completamente desarrollados el sistema cardiovascular, nervioso y digestivo. Otro alcance de los modelos con pez cebra es la manipulación genética que permite obtener animales transgénicos mediante restricción de genes responsables de la

producción de proteínas, o en algunos casos, la producción de organismos con órganos fluorescentes (Lange *et al.*, 1995; Zodrow *et al.*, 2004; Rubinstein, 2006; Ton *et al.*, 2006).

Los ensayos de toxicidad en pez cebra nacieron ante la necesidad de evaluar las consecuencias en el desarrollo del sistema nervioso al estar expuesto a compuestos químicos nocivos en el ambiente, permitiendo elaborar modelos rápidos y económicos que discriminaran el potencial tóxico antes de pasar a pruebas en mamíferos. Posteriormente, conforme aumentaron las investigaciones sobre el desarrollo embrionario del pez cebra, aparecieron los ensayos inmunohistoquímicos en organismos completos, ya que los embriones de esta especie son transparentes, lo que permite observar marcaje *in vivo*. Es importante aclarar que los ensayos preclínicos en pez cebra no sustituyen a las pruebas en mamíferos, sin embargo presentan características que facilitan su utilización en la evaluación de la embriotoxicidad (Cole & Ross, 2001; Negron & Lockshin, 2004; Stehr *et al.*, 2006; Barros *et al.*, 2008).

3.2. Metodología

3.2.1. Alojamiento de los individuos

Para la obtención de embriones viables, fue fundamental mantener a los peces adultos en óptimas condiciones, que posteriormente fueron utilizados en las cruas. Con este objetivo se rediseñó el sistema de alojamiento de tal manera que las peceras fueran alimentadas por un flujo de agua continuo que permitiera la oxigenación y un desagüe que evitara fugas.

Se utilizaron cuatro peceras con tapa con una capacidad de 6 L para el alojamiento de los peces, a las cuales se les realizó una perforación de 20 mm en su cara lateral para instalar el desagüe y en la tapa en su región central para la tubería de alimentación de agua; estas fueron colocadas en un anaquel tubular de 29 x 23.5 x 15 cm. El sistema de recirculación de agua fue compuesto por una bomba sumergible de 1/200 HP colocada en un tanque principal con capacidad de 40 L conectada a un filtro de celulosa con poro de 50 µm seguido de un sistema de enfriamiento compuesto por un serpentín de 8 metros de manguera depositados en un contenedor hermético conteniendo hielo para mantener una temperatura de 28 °C. Dicho contenedor fue adaptado a una tubería que llevó el flujo de agua a través de una lámpara UV de onda larga como medio de purificación. La vertiente de salida fue conectada a una instalación hidráulica de 20 mm de diámetro que dispuso las peceras a un flujo constante. Por último, el sistema de desagüe comenzó por el orificio lateral de la pecera, al cual le fue adaptado un conector de 90° que sirvió como drenaje de las peceras. El agua drenada fue dirigida mediante un tubo de PVC hidráulico de 2" a un tubo colector de 25 mm de diámetro el cual finalizaba en el tanque principal, donde el flujo saliente pasó por un filtro compuesto por fibra, zeolita, carbón activado y cerámica fijadora de bacterias denitrificantes, lo que permitió una filtración de los detritos provenientes de las peceras y una regulación del pH.

3.2.2. Cruas naturales preliminares

Antes de cada crua los individuos fueron correctamente sexados mediante sus características dimórficas. En primera instancia, las cruas se realizaron a pequeña escala, utilizando un recipiente plástico de 30 x 15 x 15 cm, al cual le fue adaptada una cámara interna fabricada con malla plástica. Dicha malla generó un espacio de 0.5 cm

entre el fondo del recipiente y la base de la adaptación, lugar donde caerían los huevos fecundados. Se utilizaron tres machos y dos hembras, que fueron colocados en la cámara de cruce alrededor de las 19 horas del día anterior al experimento, separados por un fragmento de malla plástica. Al día siguiente, alrededor de las 8 horas, cuando las luces aún no se encendían, se retiró el separador plástico lo que permitió la interacción de los animales. La cámara de cruce fue revisada cada hora hasta observar la aparición de los huevos fecundados en el fondo. Posteriormente los peces fueron retirados y aislados en una pecera, mientras que los huevos obtenidos fueron lavados con agua del sistema y separando los fertilizados en cajas Petri conteniendo solución para embriones (1 mg de sal libre de yodo en 5 L de agua destilada). Los embriones fueron transferidos a placas de microtitulación con fondo plano con medio salino y mantenidas a 28 °C para el monitoreo de la morfología de los individuos, mediante análisis de imagen. De manera conjunta se calculó en índice de malformaciones natural en tres cruces diferentes.

3.2.3. Implementación del método de puntaje general de desarrollo

Las pruebas de embriotoxicidad en el pez cebra proporcionan un simple y rápido método para estudiar la toxicidad de químicos en un organismo completo en desarrollo. Hermesen y cols. en 2011 diseñaron un sistema de evaluación cuantitativa que permite valorar el desarrollo de los embriones del pez cebra, basado en puntos específicos del tiempo (12, 18, 24, 48 y 72 h) mediante una tabla que genera un puntaje general de desarrollo (Hermesen *et al.*, 2011).

Dicho puntaje fue desarrollado tomando como referencia un sistema de puntaje similar en rata evaluado en los años ochenta, que permite la evaluación morfológica precisa en puntos específicos del desarrollo embrionario, respaldándose en la descripción morfológica del pez cebra propuesta por Kimmel y cols., en 1995 (Kimmel *et al.*, 1995).

En primera instancia se llevó a cabo una prueba para comprobar la proporción máxima de dimetilsulfóxido (DMSO) que toleraban los embriones sin coagularse en el periodo de observación (72 horas). Se montaron tres grupos (n=20) en una placa de 96 pozos de fondo plano, colocando cuidadosamente un embrión en estadio de 64 células (2 horas *post* fertilización (hpf)) en cada pozo, acto seguido se adicionaron 250 µL de solución de DMSO en diferentes proporciones en solución para embriones (60 µg de sales InstantOcean por litro de agua destilada) por pozo siguiendo el siguiente esquema: Al

grupo 1 se le adicionó DMSO al 10%, al grupo 2 DMSO al 1% y al grupo 3 DMSO al 0.1%. Los resultados mostraron que el 100% de los embriones sometidos a la solución de DMSO al 10% coagulaban en las primeras 24 hpf. Para el caso de las concentraciones menores no se observó un efecto en el desarrollo de los embriones, por lo que se determinó que la proporción utilizada como vehículo sería DMSO al 1% en solución para embriones.

Posteriormente se tomó la tabla de puntaje general de desarrollo propuesta por Hermesen y se ensayó en tres camadas de embriones, utilizando una n=16 por grupo (N=192), de acuerdo a la Figura 4. Esto para corroborar la presencia de las características morfológicas en los tiempos de corte propuestos, además de obtener las concentraciones mínimas donde el 100 % de los embriones coagulaban (van den Brandhof & Montforts, 2010; Hermesen *et al.*, 2011).

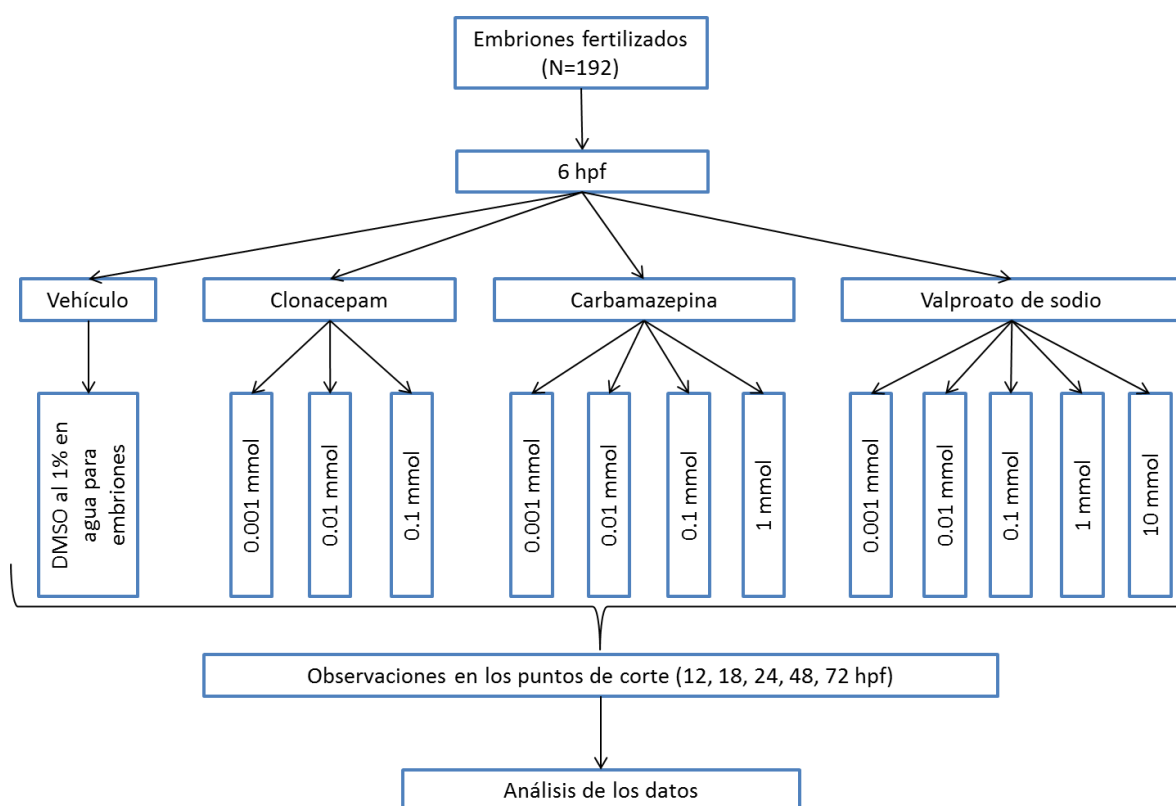


Figura 4. Esquema de la distribución de los grupos experimentales para obtener las concentraciones mínimas de coagulación de embriones en el modelo de embriotoxicidad en pez cebra.

Una vez obtenidas dichas concentraciones, se propuso un segundo experimento, en el cual se formaron grupos experimentales para evaluar la embriotoxicidad de los controles farmacológicos y de los dos compuestos sintetizados, utilizando el mismo vehículo (DMSO al 1%) como se indica en la Figura 5. Cabe aclarar que en esta fase, todos los experimentos fueron realizados por triplicado, realizando las lecturas y obteniendo evidencia en videos mediante una adaptación de una cámara web al ocular de un microscopio de disección invertido. Los animales fueron manejados de acuerdo a los lineamientos del Canadian Council on Animal Care (CCAC, 2005).

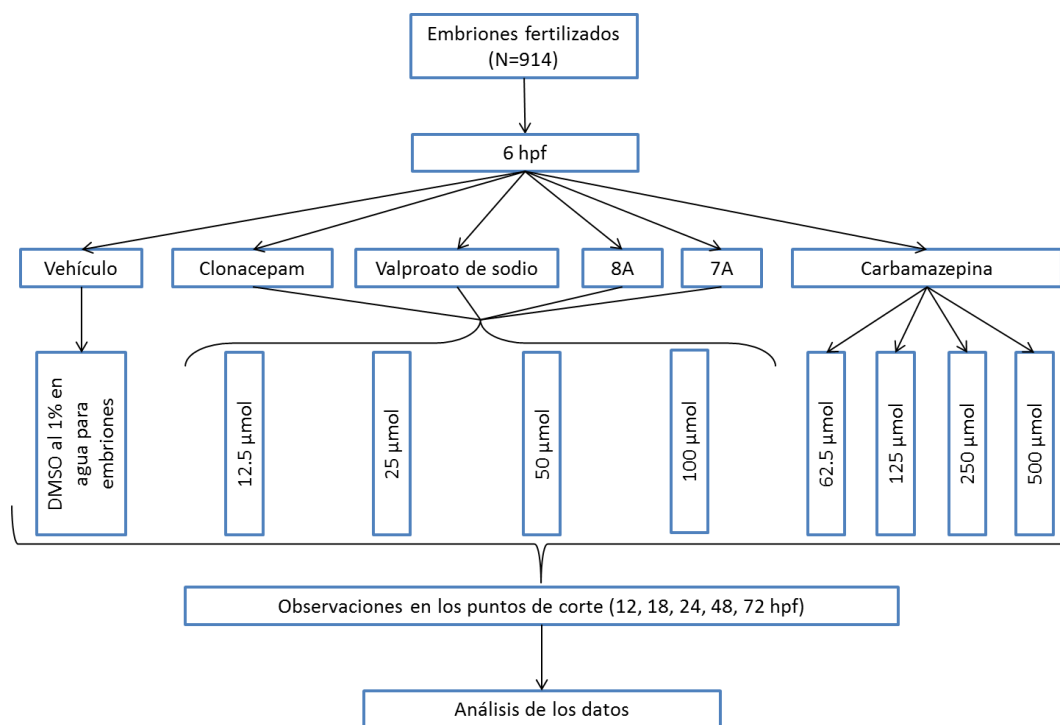


Figura 5. Esquema que muestra el diseño experimental para la evaluación de la embriotoxicidad de los controles farmacológicos y los dos compuestos sintetizados en un modelo de pez cebra.

3.3. Análisis estadístico

Para los datos del primer experimento, se siguió el análisis de datos propuesto por Hermesen y cols., donde las concentraciones utilizadas son graficadas como el logaritmo base 10 contra el puntaje máximo de la escala general de desarrollo, que se alcanza a las 72 horas, no tomando en cuenta los puntos de corte anteriores. Aunado a esto se determinó el índice de teratogenicidad, dividiendo el número de malformaciones en los individuos entre el total de individuos del grupo. Para el segundo experimento, se propuso

un análisis que permitiera utilizar todos los datos obtenidos en los distintos puntos de corte (12, 18, 24, 48 y 72 hpf); para este análisis fue utilizada una ANOVA de medidas repetidas de dos factores (Fármaco y Concentración) por ranqueo secuencial, utilizando un ranqueo fraccionado como porcentaje, debido a que existían grupos donde sin varianza, cuando $p < 0.05$, se efectuó una prueba post hoc de Tukey para observar diferencias entre los compuestos evaluados y los controles farmacológicos. Los paquetes estadísticos manejados fueron STATISTICA 7, JMP 6 y SIGMA PLOT 10.0.

3.4. Resultados

3.4.1. Optimización del sistema de alojamiento de los organismos.

Al inicio del proyecto se contaba con un sistema de alojamiento prototipo el cual constaba de cuatro peceras alimentadas por mangueras de 0.5 cm de diámetro, oxigenadas por bombas independientes (Figura 6). Sin embargo, este sistema llevó a diversos inconvenientes como fugas constantes, niveles de amoníaco elevados, altas temperaturas y alta morbilidad y mortalidad de los organismos, llegando a perder hasta el 70% de la población por intoxicación con contaminantes.

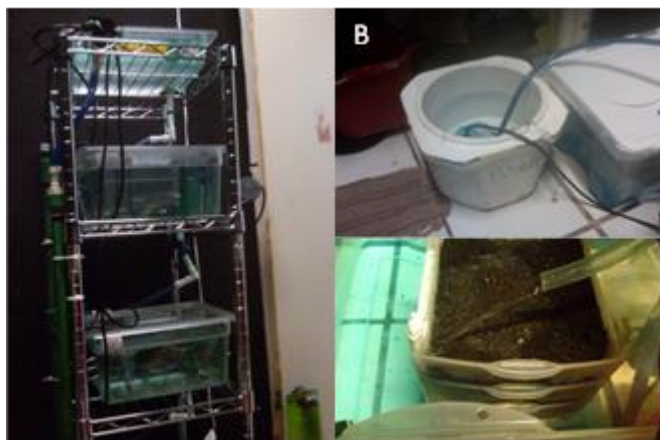


Figura 6. Sistema piloto de alojamiento del pez cebra. A) Peceras suministradas por la red de mangueras; B) Bomba sumergible; C) Filtro de fibra, zeolita, carbón activado y cerámica fijadora de bacterias desnitrificantes.

Por lo anterior, se adecuó un sistema que permitiera una recirculación constante del flujo de agua y que por sí mismo mantuviera un nivel de oxigenación que no dependiera de bombas, si no de la caída de agua. Inicialmente, se optó por mantener a la bomba sumergible dentro del tanque principal, de la misma manera que el filtro de fibra y carbón con la finalidad de recircular el agua saliente, así como recibir el agua drenada de las peceras (Figura 7).

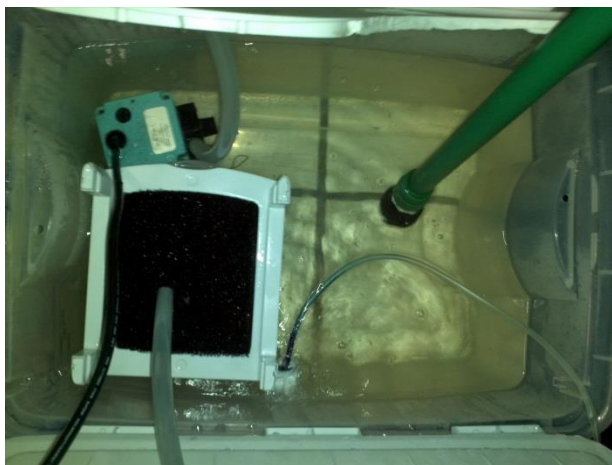


Figura 7. Tanque principal donde se observa la bomba de recirculación de agua (azul) y sistema de filtros al cual llega el drenaje de las peceras (negro). Foto tomada por el autor.

Una vez terminada la sección del tanque principal se procedió a ensamblar un sistema de tuberías que permitiera un buen flujo de agua, por lo que se utilizaron tuberías hidráulicas de 25 mm de diámetro adicionando un filtro comercial de celulosa para retirar cualquier partícula mayor o igual a 50 μm , asegurando un flujo de agua libre de sólidos suspendidos. Posterior a este filtro se colocó el sistema de enfriamiento, lo que resolvió el problema de la elevación de temperatura; este sistema estaba conformado por un tramo de 8 metros de manguera hidráulica insertados en un contenedor hermético con capacidad de 5 galones (18.9 L), este contenedor permitió mantener la manguera sumergida en hielo, reduciendo la temperatura de 33 a 26 °C, lo que se vio reflejado en una población bacteriana menor, reduciendo el riesgo de enfermedades para los peces (Figura 8).



Figura 8. Sistema de tuberías hidráulicas (verde) conectadas al filtro de celulosa (negro) y posteriormente al sistema de enfriamiento (amarillo). Foto tomada por el autor.

La salida del contenedor de enfriamiento fue conectada a una lámpara UV de flujo continuo que permite la desinfección del agua mediante la inactivación del DNA de las bacterias utilizando luz en un rango de 200 a 260 nm, lo que provoca dimerización de bases. Este sistema de desinfección de agua fue conectado a una línea hidráulica que dispensó las peceras con agua correctamente filtrada y desinfectada, con un flujo de 920 mL/min (Figura 9 y Figura 10).

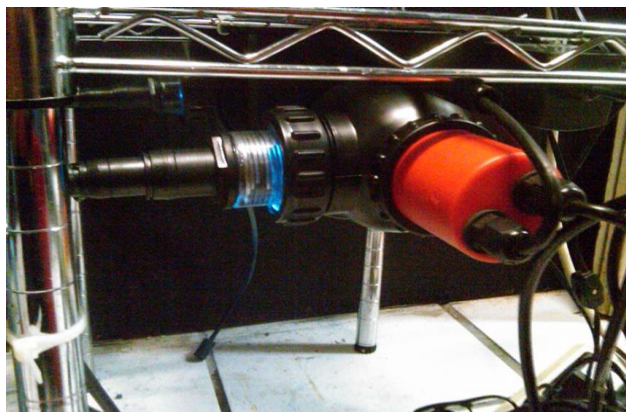


Figura 9. Lámpara UV de flujo continuo

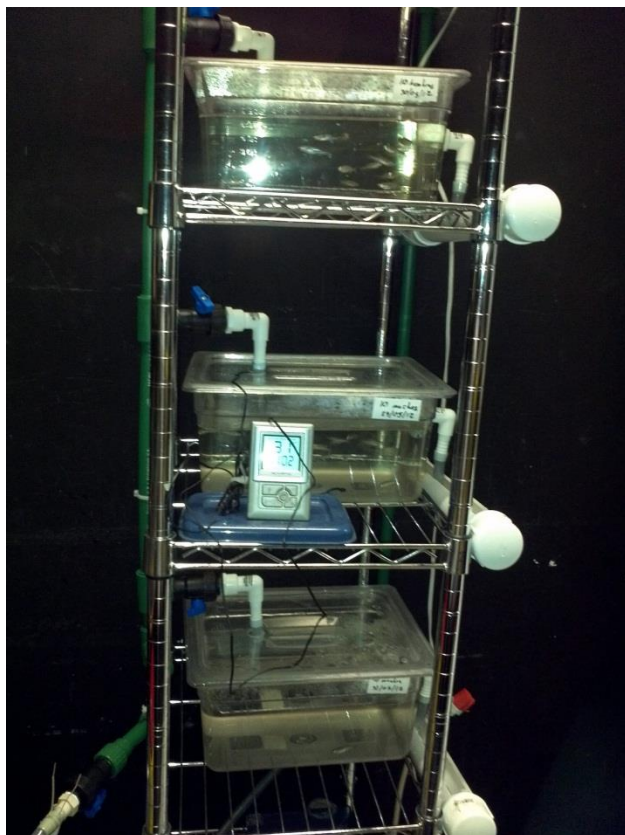


Figura 10. Tubería de dispensación de agua (verde) donde se observa una serie de 4 llaves que permiten controlar el flujo de entrada de agua a las peceras por la parte superior.

Finalmente el sistema de drenaje de agua partía de un conector de 90° adaptado en una de las caras laterales de las peceras que generaba un efluente de 950 mL/min, este flujo de agua fue dirigido a una tubería bajante de 20 mm de diámetro mediante unos canales de PVC de 2". Toda el agua colectada por el drenaje se dirigió al filtro contenido en el tanque principal, concluyendo así el sistema (Figura 11). Cabe resaltar que a partir de la instalación de este complejo, la mortalidad en los organismos se redujo a cero con lo que se cumple la premisa de mantener a los peces en condiciones óptimas.

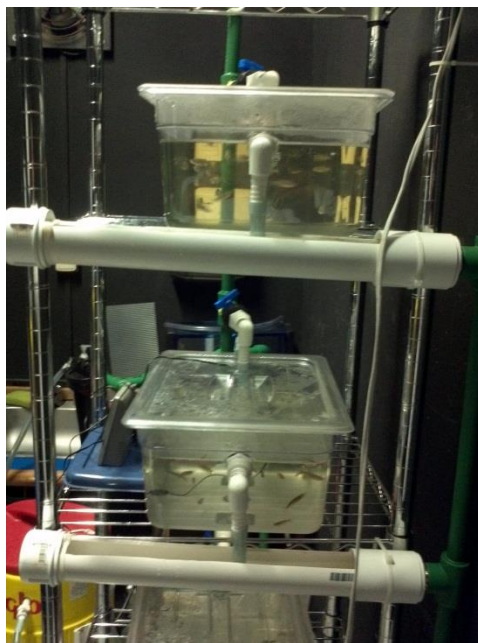


Figura 11. Sistema de drenaje donde se observan los canales de PCV (blanco) que llevan el efluente de agua a una tubería bajante (derecha verde). Foto tomada por el autor.

3.4.2. Cruzas preliminares

Todos los individuos sometidos a cruce se mantuvieron agrupados en machos y hembras en las peceras de alojamiento, sin embargo, antes de cada experimento de cruce los peces fueron sexados mediante sus características dimórficas. Los machos se caracterizan por tener una forma fusiforme alargada y presentar una coloración amarilla en sus rayas claras, mientras que las hembras son un poco más voluminosas, además de presentar una coloración mayormente plata, acompañada de una papila en su porción ventral característica (Figura 12).

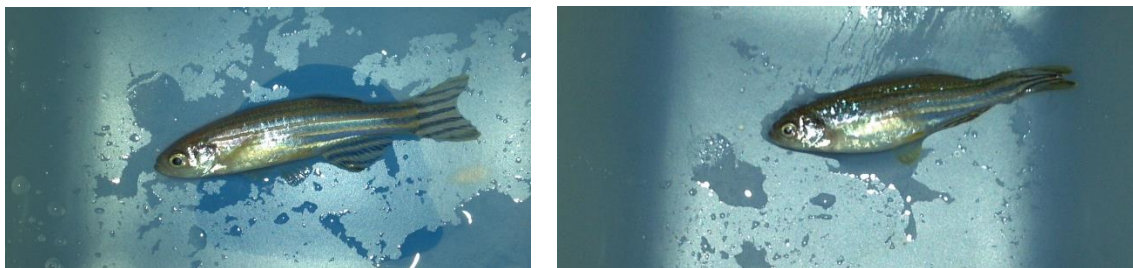


Figura 12. Se presenta la morfología de un macho (izquierda) donde se observa un cuerpo fusiforme alargado con rayas oscuras características y una tonalidad amarilla en las porciones claras del organismo. En la morfología de la hembra (derecha) se denota un cuerpo de mayor

volumen presentando las bandas oscuras características pero con una tonalidad mayormente plata en las regiones claras, además de presentar una papila en su región ventral.

Los organismos fueron colocados en la cámara de cruza, a razón de 2 a 3 hembras por 3 machos. Después de varios experimentos de cruza se determinó que las condiciones ideales para obtener cruza eficientes fueron a una temperatura de 28 °C y con animales alimentados con *Artemia salina* o *Daphnia sp*, siendo también parte crucial el colocar esferas de cristal coloreadas en el fondo, ya que sin estas condiciones las cruza no tenían éxito. Los animales fueron aislados el día anterior a la prueba en la cámara de cruza, separando a hembras de machos para generar un ambiente feromónico adecuado retirando la separación el día de la prueba antes de encenderse las luces (Figura 13).



Figura 13. En el lado izquierdo se observan a los peces sometidos a cruza separados en hembras y machos, mientras que al lado derecho los peces se encuentran interaccionando después de retirada la separación.

De aproximadamente diez experimentos de cruza, se tuvo éxito en tres de ellos, en los cuales se obtuvieron entre 60 y 200 huevos fertilizados (Figura 14). La baja producción de embriones se puede adjudicar al estrés de manipulación y los espacios reducidos de cruza (Adatto, 2011). Los embriones fueron conservados en cajas Petri y algunos de ellos transferidos a placas de microtitulación con fondo plano para observar su morfología y desarrollo a las 2, 24, 48, 72, 96 y 120 hpf (Figura 15), presentándose un porcentaje de deformidades naturales del 4 % en promedio (Figura 16). Dichos organismos presentaron una sobrevivencia de 15 días a partir de la cruza debido al abastecimiento de alimento para larvas.



Figura 14. Huevos fertilizados obtenidos por cruza natural observados al microscopio. Foto tomada por el autor.

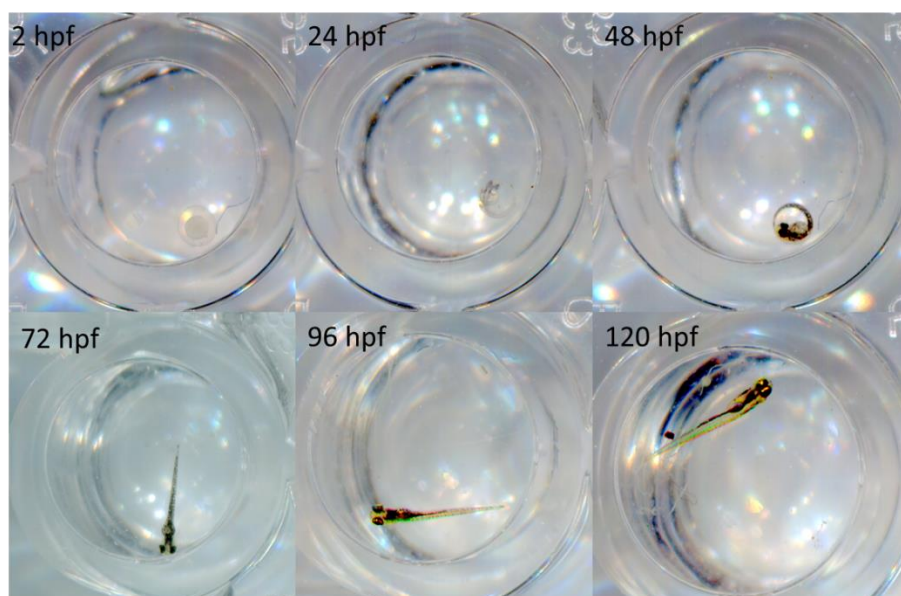


Figura 15. Etapas del desarrollo de embriones de pez cebra a partir de las 2 hpf (horas post fertilización). Imagen digitalizada por el autor.

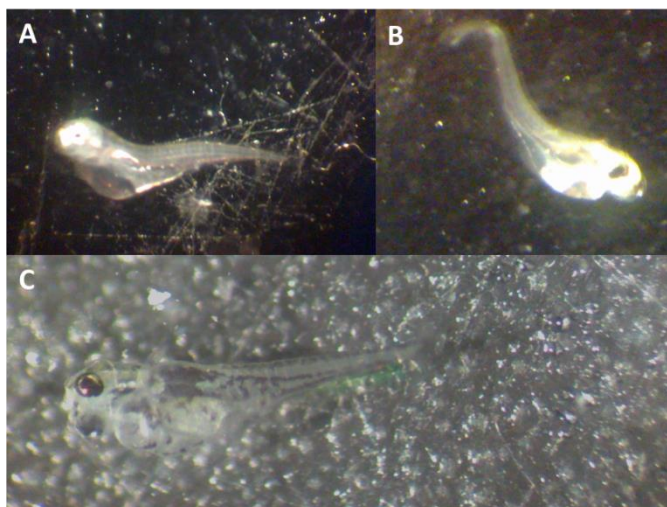


Figura 16. Organismos con deformidades congénitas. A) Conducto espinal arqueado y edema pericárdico; B) Conducto espinal y cola arqueada; C) Edema pericárdico. Imagen tomada por el autor

3.4.3. Puntaje General de Desarrollo

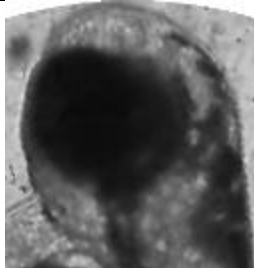
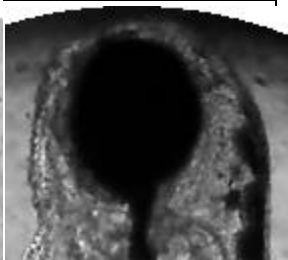
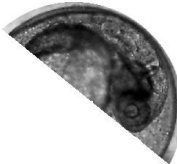
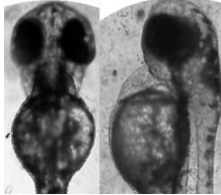
Antes de realizar las pruebas experimentales de neurotoxicidad en los embriones, se elaboró una tabla de puntaje de morfología normal en el desarrollo tomando como referencia tres cruas consecutivas, utilizando un método semicuantitativo, distribuido de la siguiente manera:

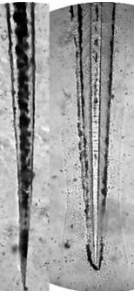
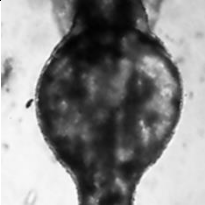
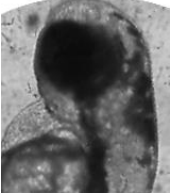
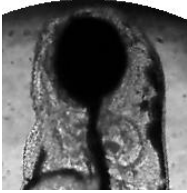
De acuerdo a los resultados obtenidos en los tres ensayos los valores del puntaje general de desarrollo varían en dos puntos de observación como se muestra en la Tabla 1 y la Tabla 2.

Tabla 1. Puntaje de morfología general propuesto por Hermesen.

Puntaje de morfología general				
Característica/punto final	12/18 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs
Desarrollo de la cola	12 h=0	2	3	3
	18 h=1			
Formación de los somites	NO=0	SI=1	SI=1	SI=1
Desarrollo ocular	1	2	2+1 por pigmentación	2+1 por pigmentación
Movimiento	NO=0	SI=1	SI=1	SI=1
Latido del corazón	NO=0	SI=1	SI=1	SI=1
Circulación sanguínea	NO=0	NO=0	SI=1	SI=1
Pigmentación cabeza-cuerpo	0	0	1	1
Pigmentación de la cola	0	0	1	1
Aparición de la aleta pectoral	0	0	0	1
Protuberancia bucal	0	0	0	1
Eclosión	NO=0	NO=0	NO=0	SI=1
TOTAL	2	7	12	15

Tabla 2. Puntaje de morfología general obtenido en tres camadas de embriones (N=60).

Característica/punto final	12/18 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf
Desarrollo de la cola	 12 h=0	 2	 3	 3
Formación de los somites	NO=0	SI=1	SI=1	SI=1
Desarrollo ocular	 1	 2	 2+1 por pigmentación	 2+1 por pigmentación
Movimiento	NO=0	SI=1	SI=1	SI=1
Latido del corazón	NO=0	SI=1	SI=1	SI=1
Circulación sanguínea	NO=0	SI=1	SI=1	SI=1
Pigmentación cabeza-cuerpo	0	 0	 1	 1

Pigmentación de la cola	0	 0	 1	 1
Aparición de la aleta pectoral	0	0	 0	 1
Protuberancia bucal	0	0	 0	 1
Eclosión	NO=0	NO=0	SI=1	SI=1
TOTAL	2	8	13	15

Al comparar los datos morfológicos obtenidos en el ensayo, observó que el 100% de los embriones sometidos a prueba a las 24 hpf presentaron circulación sanguínea y a las 48 hpf eclosionaban.

A continuación se describe cada uno de los parámetros morfológicos y su desarrollo en cada uno de los puntos de corte.

Primer punto de corte (12/18 hpf): A las 12 hpf se hace evidente el polo animal, así como la formación de la vesícula óptica (1 punto), así como la aparición de una porción que dará lugar más adelante a la cola, la vesícula de Kupffler. A las 18 hpf, dicha vesícula se ha desarrollado dando lugar a una cola primitiva (1 punto).

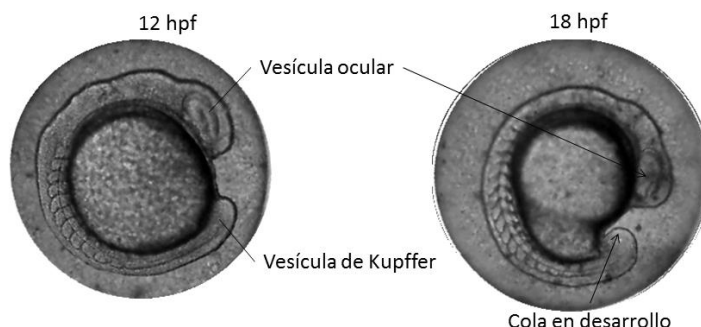


Figura 17. Desarrollo normal del embrión de pez cebra en el primer punto de corte

Segundo punto de corte (24 hpf): El desarrollo de la cola continua, habiendo desarrollo de la notocorda a partir del saco vitelino (2 puntos), agregado a esto en la porción dorsal se denota la formación de alrededor de 30 somites (1 punto). Las vesículas ópticas continúan desarrollándose, apareciendo el disco retinal, así como el inicio de la pigmentación del mismo (2 puntos). El embrión comienza a tener movimientos característicos (1 punto), y se observa un pequeño corazón entre el saco vitelino y la región más anterior de la cabeza. Dicha estructura late (1 punto) y genera circulación por todo el organismo (1 punto).

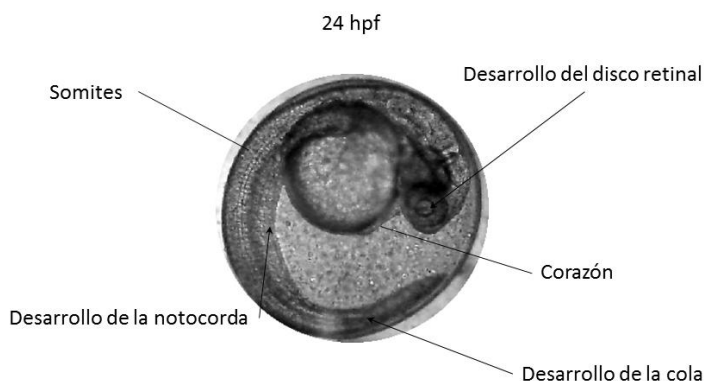


Figura 18. Desarrollo normal del embrión de pez cebra a las 24 hpf.

Tercer punto de corte (48 hpf): En este punto, el embrión eclosiona (1 punto) llegando al estadio de larva. La cola continua su crecimiento, delimitando la aleta caudal (3 puntos), y en la región dorsal los somites se diferencian del cordón espinal (1 punto), los ojos siguen creciendo y pigmentándose (2 puntos más 1 punto por la pigmentación). Los movimientos de la larva aumentan con respecto al punto de corte anterior (1 punto). El corazón termina su desarrollo y late (1 punto) generando la circulación sanguínea por todo el cuerpo (1

punto). Otra característica de este punto del desarrollo es la pigmentación de la cabeza, el cuerpo (1 punto), y la cola (1 punto).

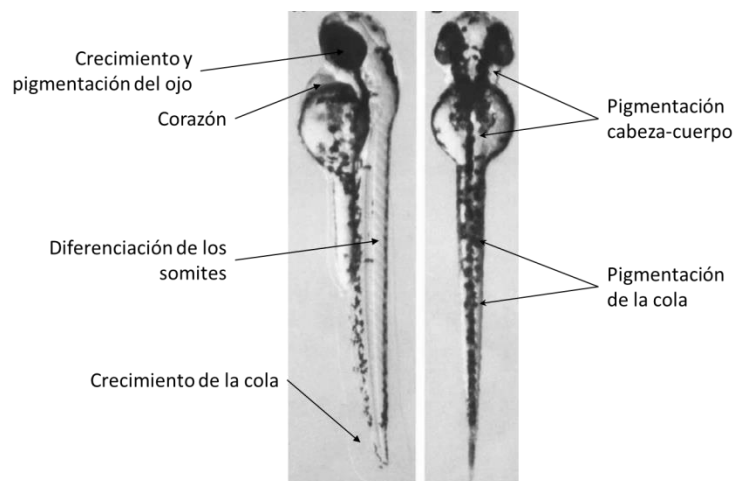


Figura 19. Desarrollo normal del embrión de pez cebra a las 48 hpf. (Tomado de Westerfield, 2007).

Cuarto punto de corte (72 hpf): En dicho punto de corte las larvas ya tienen conducta de nado (1 punto por la eclosión), la aleta caudal sigue creciendo (3 puntos), los somites están totalmente desarrollados y diferenciados del cordón espinal (1 punto). La pigmentación de los ojos aumenta así como el volumen ocular (2 puntos más 1 punto por pigmentación). Dicha pigmentación también aumenta en la cabeza, cuerpo (1 punto) y cola (1 punto). El sistema circulatorio está completamente desarrollado (1 punto) y funcional (1 punto). Agregado a esto aparecen las aletas pectorales (1 punto) y la protuberancia bucal (1 punto).

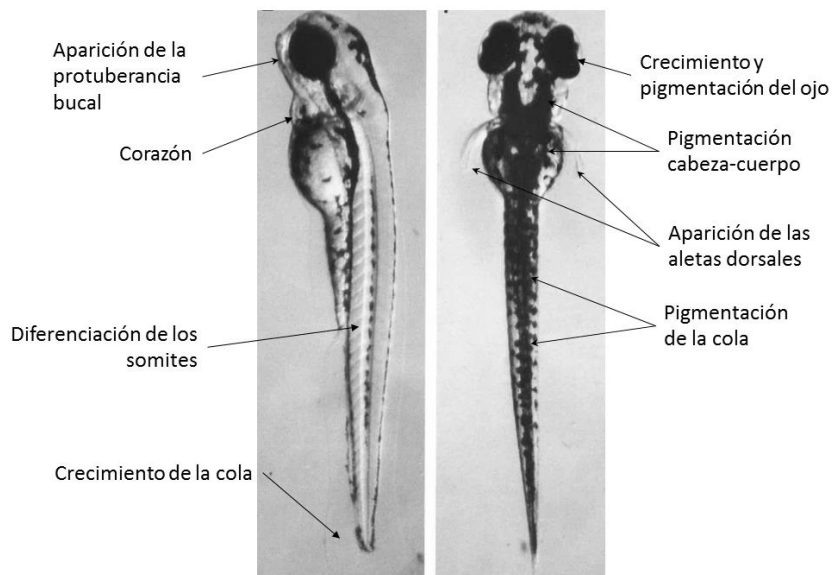
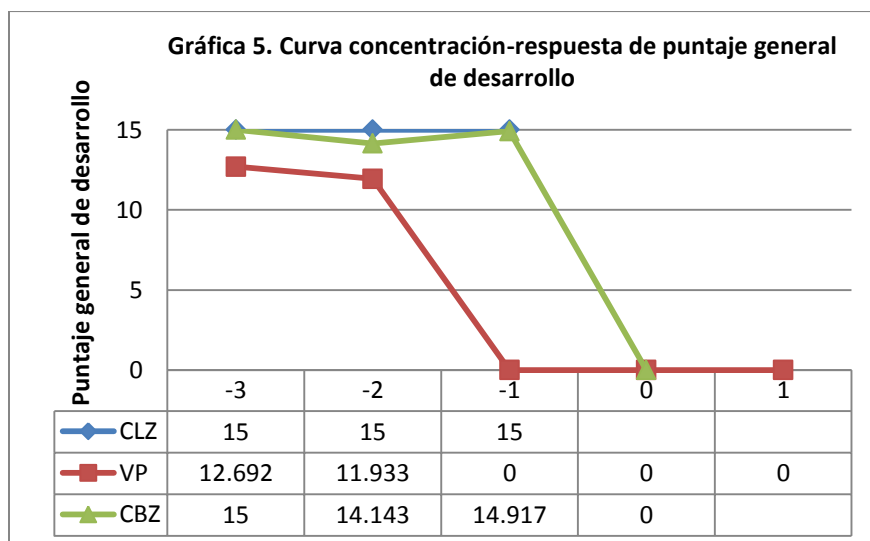


Figura 20. Desarrollo normal del embrión de pez cebra a las 72 hpf. (Tomado de Westerfield, 2007)

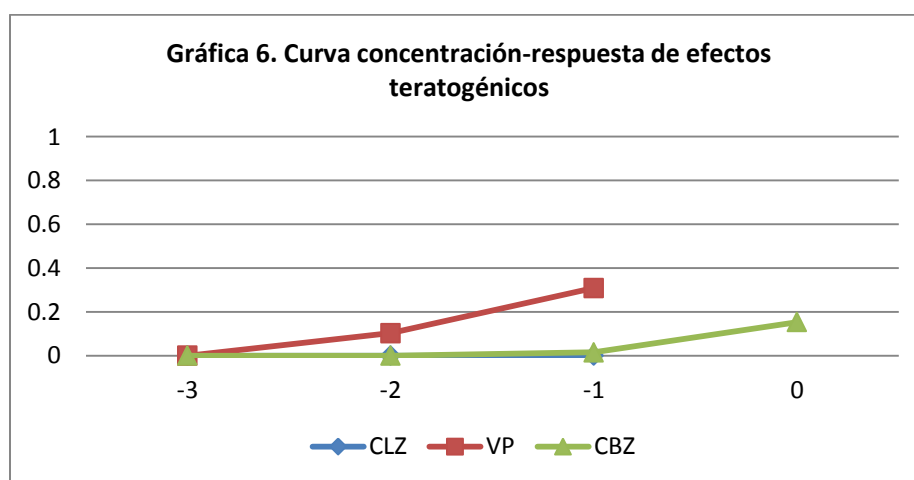
La tabla muestra los puntajes a las 12, 24, 48 y 72 horas, generando un máximo de 15 puntos cuando los organismos presentan todas las características morfológicas normales en el desarrollo.

En el primer experimento, tomando el esquema propuesto por Hermesen, el análisis de datos solo tomó en cuenta el último punto de corte, considerando el logaritmo base diez de las concentraciones utilizadas contra el puntaje general de desarrollo, como se muestra en la Gráfica 5.



La gráfica muestra que las concentraciones de clonacepam (CLZ) no tienen efecto sobre el puntaje general de desarrollo a las 72 hpf, mientras que para carbamacepina (CBZ) solo la concentración 0 (1 mmol) muestra la coagulación del 100% de la población al mismo tiempo de corte. Para el caso del valproato sódico (VP) se observó que la concentración -3 (0.001 mmol), siendo la más baja, tiene un efecto sobre el desarrollo embrionario al presentar un valor promedio de 12.692, observándose que a mayor concentración (-2, 0.01 mmol), el puntaje de morfología general va disminuyendo, y observándose que las concentraciones -1 (0.1 mmol), 0 (1 mmol) y 1 (10 mmol) coagulan al 100 % de los embriones a las 72 hpf.

Otra variable evaluada en el modelo propuesto por Hermesen es el efecto de las concentraciones sobre las malformaciones presentadas durante las primeras 72 horas del desarrollo, es decir, el efecto teratogénico. En el experimento realizado, se representa como 1 a la presencia de todas las malformaciones y cero como ausencia de todas las malformaciones. Para el caso de las concentraciones de clonacepam no se presentó ninguna malformación en los embriones, sin embargo, para los grupos de carbamazepina se observó que a partir de la concentración -1 (0.1mmol) comienzan a aparecer los efectos teratogénos llegando a un índice máximo de 0.15 en la concentración 0 (1 mmol). Para el caso del valproato de sodio se observó que la concentración de -3 (0.001 mmol) no generaba malformaciones en los embriones, sin embargo las concentraciones mayores -2 (0.01 mmol) y -1 (0.1 mmol) mostraron efecto en la presencia de malformaciones, alcanzando un índice máximo de 0.3, como se muestra en la Gráfica 6.

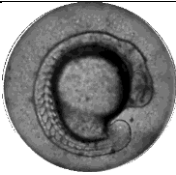
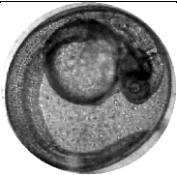
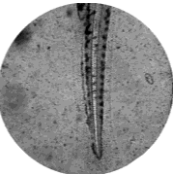
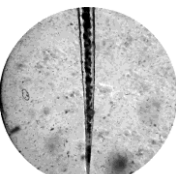
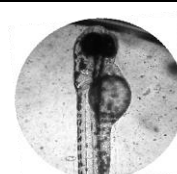
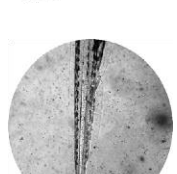
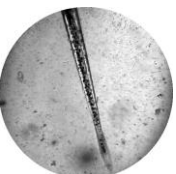
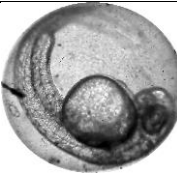
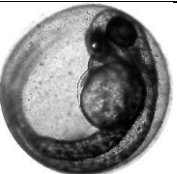
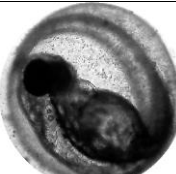


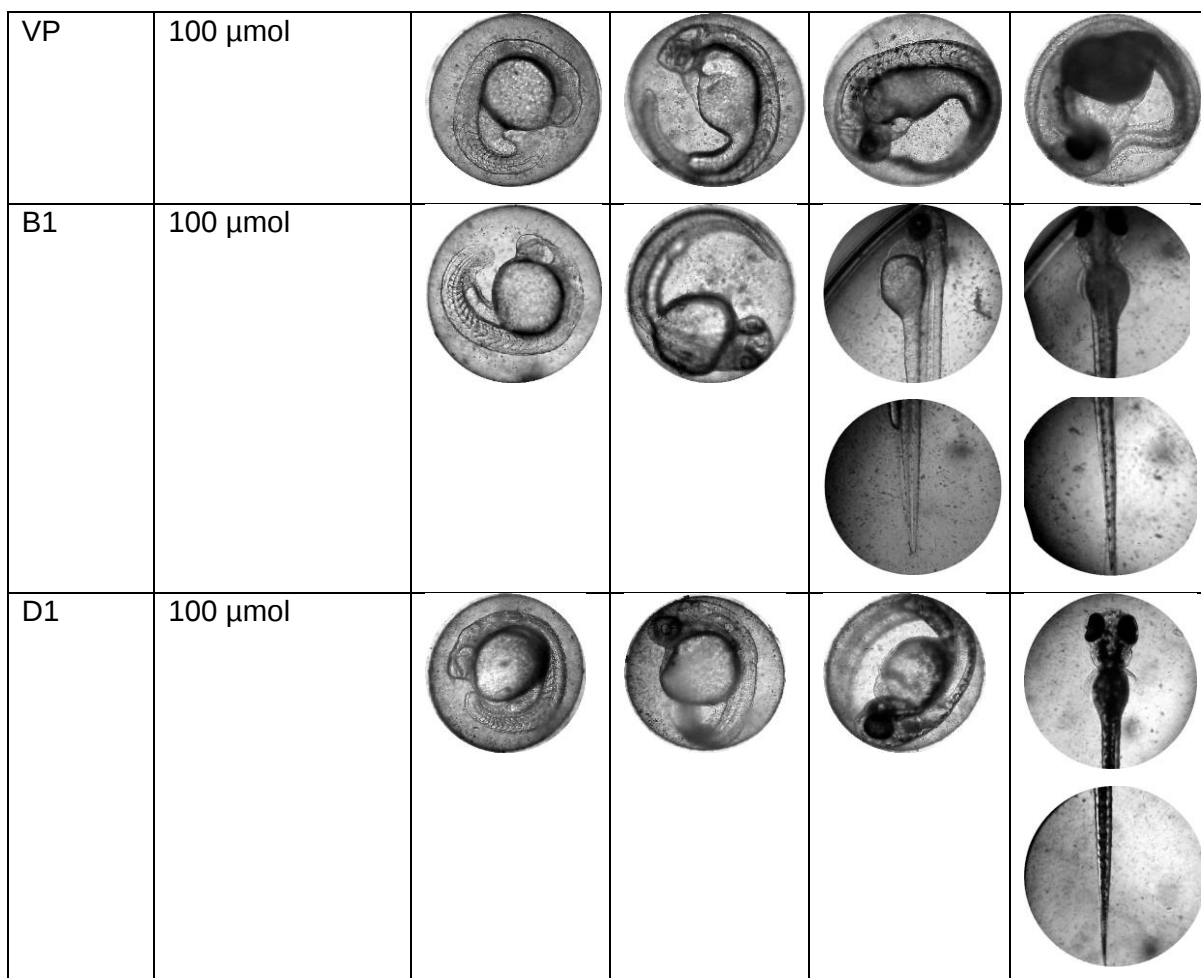
Si bien el modelo de análisis denota la significancia de los hallazgos obtenidos, solo permite ver el efecto al final del periodo de observación (72 hpf), dejando de lado los resultados obtenidos en los cortes anteriores.

En el segundo experimento, se obtuvieron imágenes mediante una adaptación de una cámara web a un microscopio de disección invertido que permitió una lectura más eficiente de las características morfológicas, así como grabar evidencia del desarrollo embrionario en cada uno de los tratamientos.

En la Tabla 3 se muestra el desarrollo de los embriones en los distintos puntos de corte, con respecto a los fármacos y la concentración más alta utilizada en cada tratamiento.

Tabla 3. Efecto de los tratamientos de mayor concentración en el desarrollo de los embriones del pez cebra.

Fármaco	Concentración	12/18 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf
Vehículo	DMSO 1%			 	 
CLZ	100 μ mol			 	 
CBZ	500 μ mol				



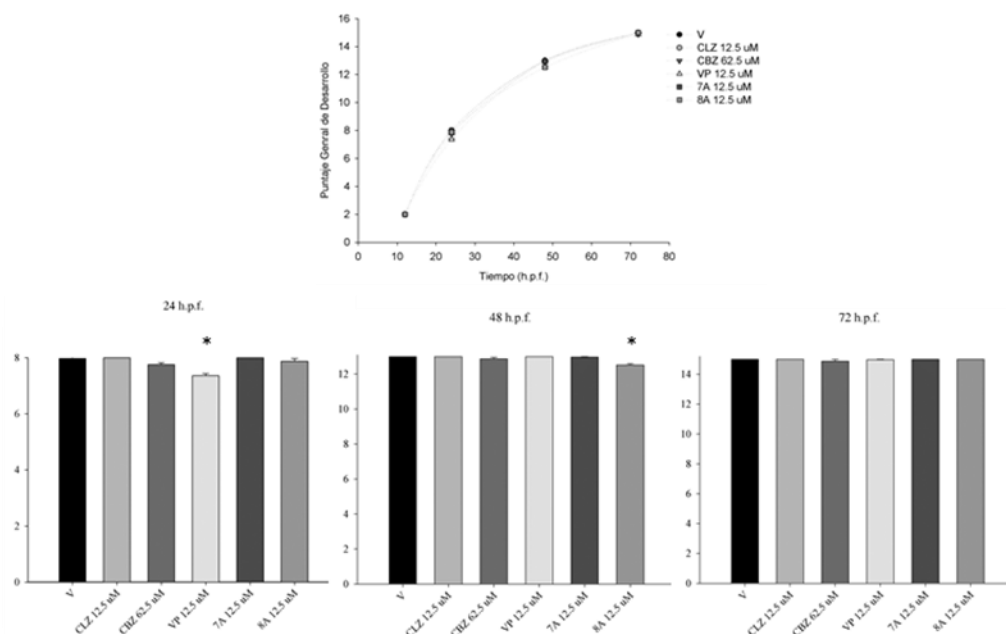
Se puede observar que los tratamientos de vehículo, clonacepam y el compuesto 7A no interfieren en las etapas del desarrollo de los embriones, mientras que el compuesto 8A retrasa la eclosión a las 48 hpf sin observarse cambios morfológicos aparentes. Para el caso de la carbamazepina, se observó que produce un retraso en la eclosión de más del 70 % de los embriones además de causar ciertas deformaciones incluyéndose el edema pericárdico y la escoliosis en la concentración más alta.

3.4.4. Evaluación de la embriotoxicidad

El análisis estadístico de los datos del segundo experimento es mostrado en 4 figuras, donde se confrontan las horas del experimento contra el puntaje general de desarrollo de los embriones dependientes del fármaco y de las concentraciones utilizadas. El análisis muestra que existen diferencias entre tratamientos, en cada concentración utilizada en los

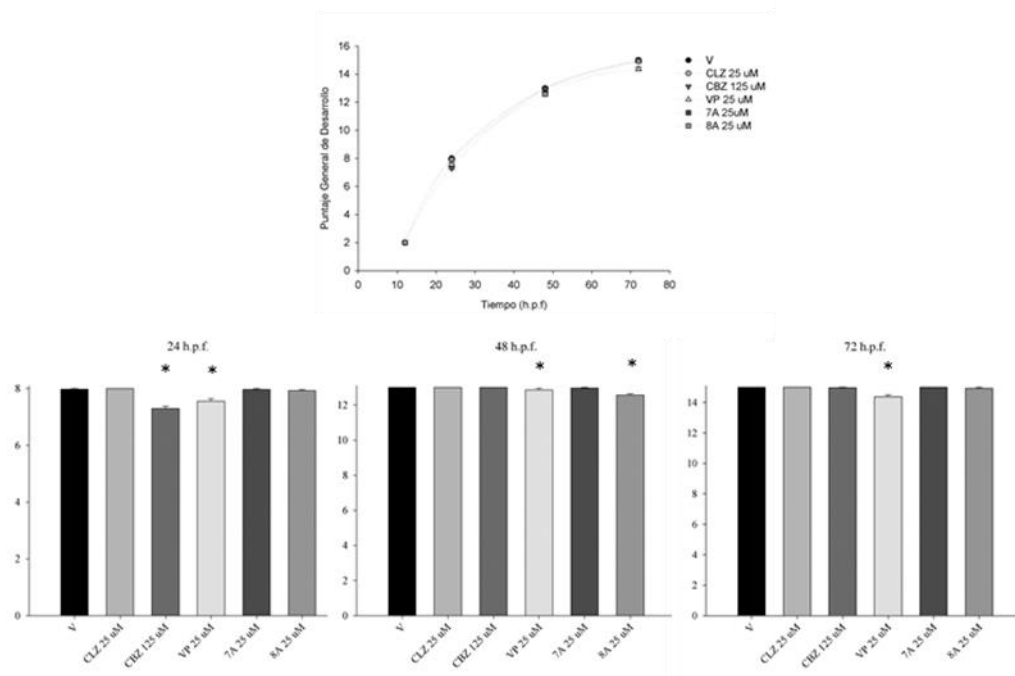
diferentes tiempos ($F_{48, 2748}=20.924$, $p<0.001$). Se muestran las medias $\pm$ errores estándar para graficar los resultados del análisis.

Debido a que las diferencias por efecto del tratamiento en cada punto de corte son difícilmente observables, se muestran gráficos para los distintos puntos de corte donde se encontraron diferencias con respecto al vehículo



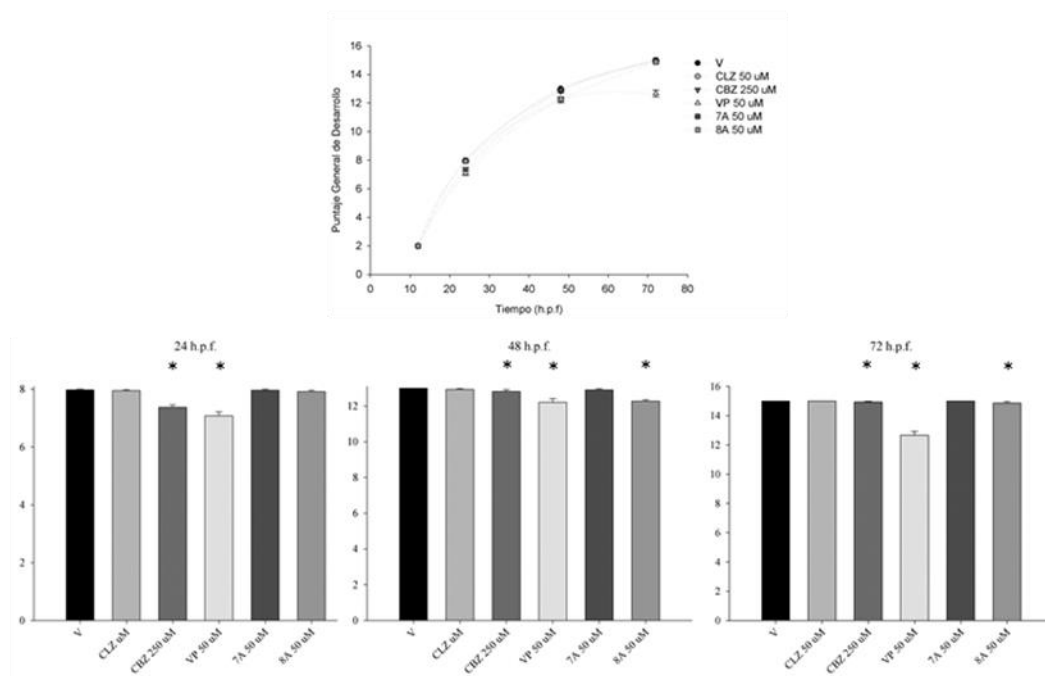
Gráfica 7 Respuesta de los embriones de pez cebra a la exposición de concentraciones bajas de CLZ, CBZ, VP, 7A y 8A con respecto al grupo V. Cada barra representa a la media $\pm$ I.C. * diferencias significativas cuando $p<0.01$ en la prueba pos-hoc de Tukey al contrastar con V

En la Gráfica 7 se puede observar que las concentraciones bajas CBZ yVP reducen el valor del puntaje general de desarrollo en las primeras 24 hpf ($p<0.01$), mientras que a las 48 hpf, CBZ y 8A muestran un ligero decremento debido al retraso en la eclosión de los embriones. Las prueba post-hoc muestra que existen diferencias significativas a las 24 hpf de CBZ y VP con respecto al grupo vehículo ($p<0.01$).En las 48 hpf se muestra que solo 8A presenta diferencias significativas con respecto al vehículo ($p<0.01$). A las 72 hpf no existen diferencias de los tratamientos con respecto a vehículo ($p\geq 0.1$).



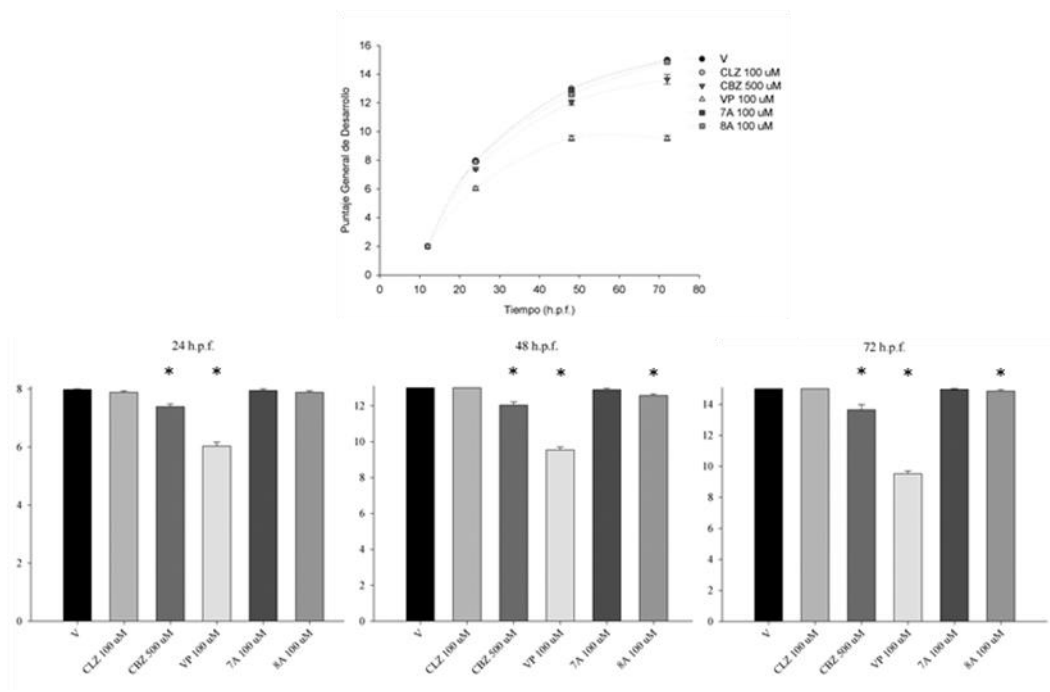
Gráfica 8. Respuesta de los embriones de pez cebra a la exposición de concentraciones media-bajas de CLZ, CBZ, VP, 7A y 8A con respecto al grupo V. Cada barra representa a la media $\pm$ I.C. * diferencias significativas cuando $p < 0.01$ en la prueba pos-hoc de Tukey al contrastar con V

En la Gráfica 8 se observa que, para las concentraciones media-bajas, tanto CBZ como VP reducen ligeramente el puntaje de los embriones a las 24 hpf ($p < 0.01$), mientras que en 48 y 72 hpf, existe un retraso en el desarrollo de los embriones expuestos a CBZ, VP y 8A ($p < 0.01$), relacionado a una eclosión tardía, con respecto al vehículo.



Gráfica 9 Respuesta de los embriones de pez cebra a la exposición de concentraciones media-altas de CLZ, CBZ, VP, 7A y 8A con respecto al grupo V. Cada barra representa a la media $\pm$ I.C. * diferencias significativas cuando $p < 0.01$ en la prueba pos-hoc de Tukey al contrastar con V

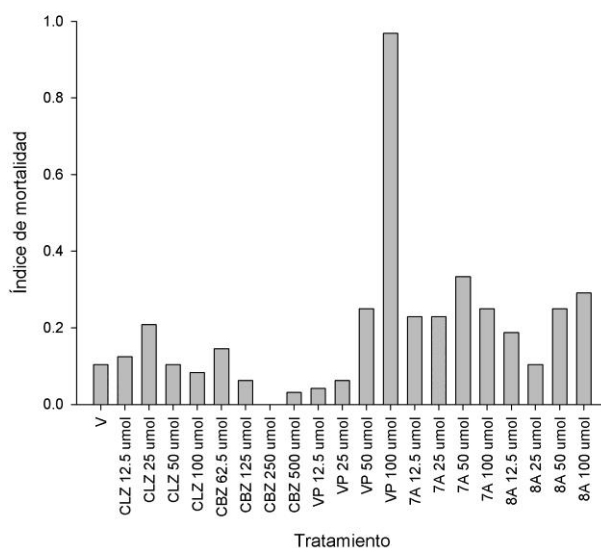
En la Gráfica 9 se observa un retraso en el desarrollo de los embriones expuestos a concentraciones media altas de CBZ y VP en las 24 hpf ($p < 0.01$), esto debido a la malformación del sistema circulatorio de los organismos. Sin embargo, en las 48 hpf CBZ, VP y 8A generan diferencias con respecto al vehículo debido al retraso en la eclosión de los embriones ($p < 0.01$). A pesar de que CBZ y 8A generan diferencias significativas, es en el grupo tratado con VP ($p < 0.01$) donde se genera un retraso importante en el desarrollo embrionario, que se refleja en poca eclosión de los individuos y alteraciones en la desarrollo del sistema cardiovascular.



Gráfica 10. Respuesta de los embriones de pez cebra a la exposición de concentraciones altas de CLZ, CBZ, VP, 7A y 8A con respecto al grupo V. Cada barra representa a la media $\pm$ I.C. * diferencias significativas cuando $p < 0.01$ en la prueba pos-hoc de Tukey al contrastar con V

En la Gráfica 10 se observa el efecto de las concentraciones altas, mostrándose un mayor impacto de CBZ y VP ($p < 0.01$) sobre el puntaje general de desarrollo. El compuesto 8A genera un retraso a partir de las 48 hpf, siendo diferente al grupo vehículo, debido a un tiempo de eclosión tardío.

Es de resaltar el fuerte impacto que produce el VP sobre el puntaje general de desarrollo, ya que, como se presenta a continuación (Gráfica 33), no solo tiene efectos sobre el desarrollo, sino también sobre la sobrevivencia de los individuos.



Gráfica 11. Índice de mortalidad de los embriones dependiente del tratamiento

Se puede observar que la mortalidad en el grupo vehículo es del 10.4 %, mientras que en las concentraciones de clonacepam la mortalidad máxima fue del 20 %. Para el caso de carbamazepina se presentó una mortalidad máxima del 15 %, y para los compuestos sintetizados una mortalidad del 30 % en el caso del VP, se observa una tendencia a aumentar la mortalidad de acuerdo al aumento de la concentración, alcanzando un máximo de 97 %.

3.5. Discusión

La teratogenicidad de los fármacos anticonvulsivos ha sido demostrada y comparada con el efecto de estos en mamíferos en investigaciones previas (Lee *et al.*, 2013). El caso del valproato de sodio es de particular atención ya que se observa un retraso en el desarrollo y la eclosión acompañado de serias deformaciones en el sistema circulatorio y motor, como son edema pericárdico y del saco vitelino, deformación del saco vitelino y la notocorda, escoliosis y en un caso específico raquisquisis. Existe literatura que soporta estos resultados en mamíferos, donde se proponen mecanismos que explican dicha toxicidad y posterior muerte embrionaria (Nau *et al.*, 1981; Khera, 1992; Lampen *et al.*, 2001). Los mecanismos por lo que estos fármacos producen deformaciones en los embriones son aun inciertos. Sin embargo, se tienen reportes de que VP muestra al toxicidad que produce deformaciones como edema pericárdico, escoliosis, deformaciones de la cola, ausencia de aletas pectorales y amplia mortalidad; estos fenotipos son relacionados con la actividad inhibidora de VP contra la histona deacetilasa lo que afecta el desarrollo normal de los sistemas cardiaco y nervioso (Cunliffe, 2004; Pillai *et al.*, 2004; Rubinstein, 2006). CBZ muestra retraso en la eclosión de las larvas y edema pericárdico en organismos expuestos a la concentración más alta (500 μ M), con una baja incidencia de defectos, lo que corresponde con estudios en mamíferos. El mecanismo propuesto para la teratogenicidad de CBZ está dirigido a la formación de un subproducto, 10,11-epóxido de carbamazepina, que pudiera ser el responsable de los efectos sobre los embriones (Hill *et al.*, 2010; van den Brandhof & Montforts, 2010). CLZ no produce un daño evidente en los embriones, pero estudios en mamíferos y humanos demuestran el potencial teratógeno de las benzodiazepinas en fetos expuestos, con características dismórficas, aberraciones del crecimiento y anormalidades en el SNC. Particularmente CLZ incrementa el riesgo de la presentación de anormalidades, sin embargo esto no ocurre en todos los casos (Sullivan & McElhatton, 1977; McElhatton, 1994; Lin *et al.*, 2004). Los compuestos 7A y 8A generan variaciones en el desarrollo, reflejado como retraso en la eclosión de la larva, sin embargo, no existen estudios previos relacionados al efecto embriotóxico de benzacepinas o benzodiazocinas. Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo, se observó que los compuestos sintetizados generan menos efectos adversos en comparación con CLZ, CBZ y VP.

CAPITULO IV

EVALUACIÓN DE LA NEUROTOXICIDAD EN TEJIDO CEREBRAL MEDIANTE LA EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO.

4.1. Antecedentes

4.1.1. Radicales libres

La generación de radicales libres *in vivo* es un fenómeno constante tanto en el metabolismo fisiológicamente normal como en la exposición a xenobióticos. Un radical libre es una especie que contiene uno o más pares de electrones desapareados con la habilidad de existir independientemente (Deavall *et al.*, 2012). Los radicales libres son altamente reactivos, y dependiendo de su concentración pueden ser benéficos o nocivos para las células y tejidos; en concentraciones bajas los radicales libres funcionan como mensajeros redox en la regulación y señalización intracelular, sin embargo, en exceso pueden inducir modificación oxidativa de las macromoléculas, inhibición de las funciones de las proteínas y promueve la muerte celular (Circu & Aw, 2010).

El oxígeno molecular (O_2) juega una doble función en la célula ya que es esencial para los organismos aerobios pero también puede actuar como radical libre al contener electrones no apareados. Aquellas moléculas químicamente reactivas que contienen oxígeno son denominadas especies de oxígeno reactivas (EOR) siendo las más representativas el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($OH^\cdot$) y el anión peróxido (O_2^{2-}). Cuando una molécula de oxígeno captura un electrón se forma el O_2^- que tiene funciones en los macrófagos, como agente destructor de agentes biológicos extraños en el proceso de fagocitosis aunque también se produce durante la fosforilación oxidativa en la cadena respiratoria dentro de la mitocondria. Por otra parte, el H_2O_2 (que es producido por reacción de dismutación del O_2^-), es menos reactivo pero con mayor capacidad de difusión por lo que puede atravesar la membrana plasmática; una de sus funciones en condiciones normales es la translocación nuclear del factor de transcripción NFkB, que subsecuentemente inicia la transcripción de genes específicos (Gaté *et al.*, 1999; Deavall *et al.*, 2012).

4.1.2. Mecanismos de defensa contra los radicales libres

Las células tienen una variedad de mecanismos de defensa que interceptan a los radicales libres para prevenir o limitar el daño intracelular y disminuir los efectos nocivos de las EOR. Por un lado, existen moléculas de bajo peso molecular conocidas

comúnmente como antioxidantes, como la vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol) y glutatión, así mismo se tienen a las enzimas antioxidantes, como la superóxidodismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (Gpx).

4.1.3. SOD

Es una familia de enzimas especializada en la eliminación del anión superóxido derivado de estímulos extracelulares, como es radiación ionizante y daño oxidativo. Existen tres isoformas de SOD bien caracterizadas en mamíferos (Miao & St Clair, 2009): SOD cobre-zinc (Cu/Zn SOD) que se localiza en el citoplasma, núcleo y membrana mitocondrial, con un peso molecular de 88 kDa y conformada como un homodímero. Esta isoforma tiene afinidad por los cationes Cu^{2+} (catalíticamente activo) y el Zn^{2+} (estabilidad de la enzima). Esta fue la primera SOD caracterizada en eucariotas y su mutación o deficiencia en la actividad está asociada al desarrollo de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), una enfermedad neurodegenerativa que ataca a neuronas motoras a nivel de cerebro, tallo cerebral y medula espinal (Miao & St Clair, 2009; Birve *et al.*, 2010). SOD manganeso (Mn SOD) se localiza en la matriz mitocondrial y es un homotetrámero de 32 kDa que utiliza al catión Mn^{2+} como catalizador. Esta isoforma es esencial para la sobrevivencia de los organismos aerobios ya que tiene una función citoprotectora, donde su sobre expresión inhibe el crecimiento de varios tipos de cáncer por lo que es considerada como una proteína supresora de tumores (Oberley, 2005; Miao & St Clair, 2009). Estudios con ratones donde se inhibe la producción de Mn-SOD mostraron que los animales mueren poco después de nacer por cardiomiopatía y neurodegeneración (Lebovitz *et al.*, 1996). SOD extracelular (ECSOD) como su nombre lo indica se encuentra en la parte más externa de la célula (membrana plasmática) así como en los fluidos extracelulares, es una glicoproteína homotetramérica de 135 kDa, que utiliza Cu^{2+} y el Zn^{2+} de igual manera que la Cu/Zn SOD. Polimorfismos que afectan la actividad de esta enzima pueden desencadenar una variedad de enfermedades cardiovasculares, neurológicas y pulmonares (Fattman *et al.*, 2003; Miao & St Clair, 2009).

4.1.4. CAT

Es una enzima que cataliza la reacción de dos moléculas de H_2O_2 en dos moléculas de agua y una de oxígeno, siendo su principal función en el organismo. La catalasa humana está compuesta por cuatro unidades homologas, donde cada una contiene un grupo hemo. La deficiencia de esta enzima se ha relacionado con incremento en la concentración de H_2O_2 ocasionando daños en la membrana celular, la cadena

transportadora de electrones mitocondrial, el metabolismo de la homocisteína y daño al DNA. Enfermedades que se han asociado a la catalasa son diabetes mellitus, susceptibilidad a hipertensión y vitíligo, y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Góth *et al.*, 2004).

4.1.5. Gpx

Las Gpx son una familia de enzimas homologas que contienen selenocisteína que catalizan el glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG). Existen 4 tipos de Gpx, Gpx-1 es la más abundante y con un papel crucial en las defensas antioxidantes al evitar los efectos nocivos de la acumulación excesiva de H_2O_2 en el interior de la célula, Gpx-2 es una enzima epitelial específica, altamente expresada en el intestino, Gpx-3 es un subtipo de enzima secretada y Gpx-4 que es un subtipo ampliamente expresado y que difiere en su sustrato específico comparado con las otras enzimas. La Gpx-1 también puede reducir la hidroxidación de lípidos y otros hidroxidados solubles. Se ha asociado la sobreexpresión de Gpx-1 a resistencia a la insulina, así como a angiogénesis por estrés reductor (Lubos *et al.*, 2011).

En conjunto estas enzimas con los antioxidantes de bajo peso molecular deben tener un balance respecto a los radicales libres producidos para generar un estado de homeostasis, sin embargo, esto no siempre sucede.

4.1.6. Estrés oxidativo

Este se produce cuando se presenta un desequilibrio entre las EOR y los sistemas antioxidantes del organismo. La falta de respuesta de los sistemas antioxidantes para eliminar el exceso de EOR puede generar un daño oxidativo incluyendo inactivación enzimática, degradación de proteínas, daño al DNA y peroxidación de lípidos (Gómez-Oliván, 2012).

4.1.7. Efectos del estrés oxidativo a nivel celular

Liperoxidación: La peroxidación de lípidos ocurre en ácidos grasos poliinsaturados, iniciando el proceso un radical $OH^\cdot$ que atrapa un hidrógeno de un metileno en la cadena alquímica del ácido graso. Bajo condiciones aerobias, un ácido graso oxidado puede reorganizarse con el O_2 para generar un radical $O_2^\cdot$, siendo este último altamente reactivo, pudiéndose unir con otros EOR y alterar proteínas de membranas (Gaté *et al.*, 1999).

Oxidación de proteínas: Las proteínas sensibles de oxidación incluyen fosfatasas, quinasas, factores de transcripción y enzimas metabólicas, teniendo un fuerte impacto

sobre la homeostasis celular por afectar directamente la señalización, la estructura y los procesos enzimáticos del metabolismo. La oxidación puede ser inducida por diversas rutas, incluyendo oxidación catalizada por metales, oxidación de aminoácidos y conjugación de lipoperoxidos (Cecarini *et al.*, 2007).

Daño al DNA: La oxidación del DNA incluye oxidación de las bases púricas y pirimídicas (en especial la guanina, por su bajo potencial de oxidación) y ruptura de la cadena de DNA (ya sea de una o de las dos hebras). La oxidación de la guanina produce al menos dos sustancias conocidas, el 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) y 2,6-diamino-4-hidroxiformamidopirimidina (FapyGua) que pueden generar mutagénesis y carcinogénesis (Gaté *et al.*, 1999; Deavall *et al.*, 2012).

4.1.8. Carpa común (*Cyprinus carpio*)

Es un organismo acuático de cuerpo alargado y algo comprimido, con labios gruesos que tienen dos pares de barbillas en el ángulo de la boca. Son de color variable, pues las carpas silvestres son verduscas pardosas sobre el dorso con tonalidad amarilla dorada ventralmente. Las carpas viven en corrientes media y bajas de los ríos, en áreas inundadas y en aguas confinadas poco profundas, son principalmente habitantes de fondo, pero buscan alimento en la parte media y superior del cuerpo de agua. Son animales versátiles que pueden desarrollarse en aguas que van de los 23 °C a los 30 °C y pH de 6.5-9.0, con capacidad de sobrevivir a inviernos fríos y con gran valor económico debido a que el 80% de los cuerpos de agua tienen como parte de su fauna a las carpas (FAO, 2014).

4.1.9. *Cyprinus carpio* como modelo de toxicidad por estrés oxidativo

Como se mencionó anteriormente, la exposición a xenobióticos (donde se pueden incluir a los fármacos) produce una elevación de las EOR, induciendo un desbalance contra las defensas antioxidantes del organismo, generando estrés oxidativo. Para evaluar el grado de daño inducido por tóxicos se hace uso de los bioindicadores que pueden definirse como cualquier medida bioquímica o cambio fisiológico o morfológico asociado a la exposición a un agente tóxico (Barata *et al.*, 2005). Actualmente los estudios enfocados a toxicidad preclínica y ecotoxicología han hecho uso de organismos de la familia *Cyprinidae* para entender los mecanismos de acción de los xenobióticos, debido a su rápido desarrollo, fácil y barato mantenimiento y sensibilidad a diversos agentes tóxicos que permiten realizar ensayos rápidos con respecto a otras familias de vertebrados (Rubinstein, 2006; Eimon & Rubinstein, 2009; Lee *et al.*, 2013; Islas-Flores *et al.*, 2014)

Recientemente *C. carpio* ha sido utilizado como organismo de prueba para evaluar el efecto oxidante de la exposición subaguda a fármacos, específicamente con antiinflamatorios no esteroideos, como diclofenaco e ibuprofeno (Islas-Flores *et al.*, 2013, 2014). Por otra parte, fármacos anticonvulsivos como son CBZ y VP han sido evaluados en *Danio rerio*, otro miembro de la familia *Cyprinidae*, utilizando embriones en desarrollo y confirmando su potencial tóxico (Lee *et al.*, 2013), sin embargo, no existen estudios que comprueben la inducción de estrés oxidativo por estos fármacos en carpa común, generando una línea de investigación que nos permita obtener datos que sirvan de base para la investigación de la toxicidad de moléculas con potencial farmacológico como es el caso de los análogos de benzodiacepinas evaluados en este proyecto.

4.2. Metodología

4.2.1. Evaluación del estrés oxidativo en tejido cerebral de carpa

Se utilizaron carpas comunes (*Cyprinus carpio*) de 7-15 cm de longitud obtenidas de un criadero carpícola en Tiacaque, Estado de México, que fueron transportadas a las instalaciones del laboratorio en bolsas de polietileno conteniendo agua oxigenada, los organismos se aclimataron por 15 días antes de los experimentos en peceras de cristal con agua dechlorinada a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 7.5-8. Tres cuartas partes del agua fueron reemplazadas cada 24 horas para mantener un ambiente óptimo. En este tiempo, los individuos fueron alimentados con Nutripec dos veces al día y alojados bajo un ciclo de luz-obscuridad 8/16.

4.2.2. Exposición de los organismos a los compuestos de interés

Debido a que estudios previos han reportado que concentraciones de fármacos que se encuentran en el rango de ng/L a $\mu\text{g/L}$ producen efecto sobre los biomarcadores de evaluación del estrés oxidativo, nueve carpas por grupo (N=144) se expusieron a concentraciones ambientales de CBZ ($2.1 \mu\text{g/L}$) y VP ($0.14 \mu\text{g/L}$); para el caso específico del compuesto 8A, y como se realizó en los experimentos antes descritos, se utilizó una concentración reportada para benzodiacepinas ($0.1 \mu\text{g/L}$) (Ternes, 1998; Yu *et al.*, 2006; Brodin *et al.*, 2013). Se utilizaron individuos no expuestos para el tiempo cero, el cual funcionó como, grupo control. Los periodos de exposición fueron 12, 24, 48, 72, y 96 horas (Figura 9). Los grupos de carpas se colocaron en peceras a razón de 3 peces por cada 10 L. En cada punto de corte, los animales fueron procesados como se describe en el siguiente apartado. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y las soluciones no se reutilizaron.

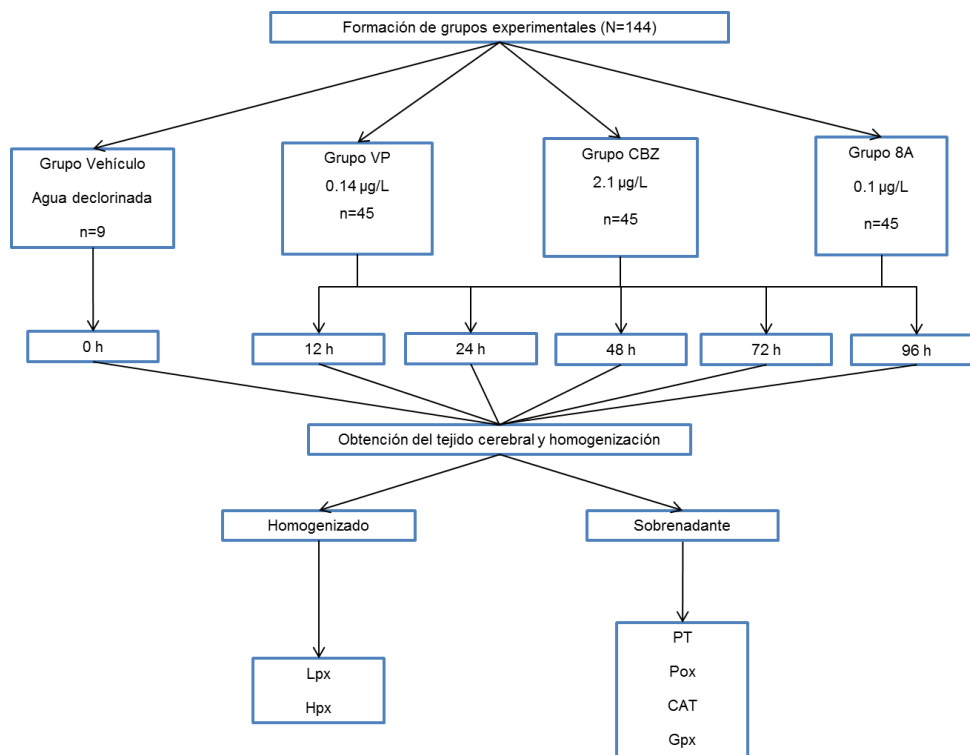


Figura 9. Esquema que muestra el diseño experimental para la evaluación del estrés oxidativo en cerebro de carpa por exposición a CBZ, VP y 8A.

4.2.3. Obtención de las muestras a partir de tejido cerebral

Los peces fueron eutanizados en baño de hielo sin utilizar ningún anestésico. Posteriormente los organismos fueron medidos y pesados individualmente; el cerebro se disectó por apertura de la cavidad craneal, siendo removido y pesado. Los cerebros (n=9) fueron depositados individualmente en un tubo de ensayo con 1 mL de PBS pH 7.4 y homogenizado. Las muestras fueron separadas en dos fracciones: la primera fracción de 500 µL se almacenó a -70 °C para la posterior determinación de lipoperóxidos e hidroperóxidos. La fracción restante fue centrifugada a 12500 rpm por 15 min. El sobrenadante resultante se utilizó para evaluar proteínas totales, proteínas oxidadas y actividad de las enzimas antioxidantes CAT y GPx.

4.2.4. Determinación de proteínas totales

Se utilizó una variante del método propuesto por Bradford, utilizando una placa de 96 pozos, donde se colocaron 2.5 µL de sobrenadante, 7.5 µL de agua desionizada y 250 µL de reactivo de Bradford [0.1 g de azul de Coomassie, 50 mL de etanol al 96%, 100 mL de

ácido fosfórico (H_3PO_4), en 1000 mL de agua desionizada]. La placa fue agitada y dejada en reposo por 5 min en oscuridad antes de evaluar la absorbancia a 595 nm en un lector de ELISA. Las muestras se montaron por duplicado y los promedios de las absorbancias fueron interpolados en una curva de albumina bovina (Bradford, 1976).

4.2.5. Determinación de Lpx

A 200 μL de homogenizado se añadieron 800 μL de PBS. Posteriormente se adicionaron 2 mL de reactivo TBA-TCA [ácido tiobarbitúrico 0.375 % (TBA, Sigma-Aldrich) en ácido tricloroacético al 15 % (TCA, Sigma-Aldrich)] agitando con vortex por 1 min. Las muestras se colocaron en baño de agua en ebullición por 15 min. El precipitado resultante fue eliminado por centrifugación a 3000 rpm por 10 min. La absorbancia fue leída a 535 nm contra blanco de reacción. El contenido de malondialdehído (MDA) fue calculado usando el coeficiente de extinción molar (CEM) de MDA ($1.56 \times 10^5 \text{ M/cm}$) (Büege & Aust, 1978).

4.2.6. Determinación de hidroperóxidos

A 200 μL del homogeneizado se adicionaron 200 μL de ácido tricloroacético al 15 %, dejando en reposo por 5 min, posteriormente la mezcla fue centrifugada a 3000 rpm por 10 min. Se tomó una alícuota de 200 μL del sobrenadante y se adicionaron 800 μL de la solución de reacción [4 mM de butilato de hidroxitolueno (BHIT), 0.25 mM de sulfato ferroso, 0.1 mM anaranjado de xileno y 250 mM ácido sulfúrico (H_2SO_4)], y fue incubada por una hora en oscuridad a temperatura ambiente. Las muestras fueron leídas a 560 nm y los valores obtenidos se extrapolaron en una curva patrón (Gay *et al.*, 1999).

4.2.7. Determinación de proteínas oxidadas

La cuantificación de proteínas oxidadas se llevó a cabo mediante el método de Levine (1994) con modificaciones. Se tomaron 100 μL del sobrenadante y se agregaron 150 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM, la mezcla se incubó durante una hora en oscuridad a temperatura ambiente, posteriormente se adicionan 500 μL de ácido tricloroacético al 6 % dejando reposar 15 min y centrifugando a 10000 rpm por 5 min a 4 °C. Se realizaron tres lavados con un mililitro de una solución acetato de etilo-etanol 1:1, hasta aclaramiento de la muestra (entre cada lavado se centrifugó a 10000 rpm por 5 min), el precipitado se disolvió en 1 mL de guanidina 6 M y se midió la absorbancia a 366 nm. Se utilizará el $\text{CEM} = 21000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para transformar la absorbancia en mM. Los datos son expresados en nM de carbonilos reactivos (C=O)/mg PT/g (Levine *et al.*, 1994).

4.2.8. Determinación de la actividad de CAT

La determinación de la actividad de la CAT se efectuó mediante el método de Radi, et al (1991). Se tomaron 40 μL de sobrenadante, se agregaron 960 μL de la solución amortiguadora de aislamiento (0.3 M sucrosa, 1mM EDTA, 5 mM HEPES y 5 mM KH_2PO_4 , pH 7.4) y 200 μL de la solución de H_2O_2 (20 mM recién preparada) antes de determinar la absorbancia a 240 nm en un tiempo de 0 y 60 seg. Se utilizaron el $\text{CEM} = 0.043 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para obtener los mM de H_2O_2 degradados durante la reacción aplicando la siguiente formula.

$$\text{Concentracion mM} = \frac{(A_{0s} - A_{60s})}{\text{CEM}}$$

Donde A_{0s} es absorbancia inicial, A_{60s} es absorbancia a los 60 s. Los datos son expresados en mM H_2O_2 /mg PT/g (Radi et al., 1991).

4.2.9. Determinación de la actividad de GPx

La determinación de la actividad de la GPx se efectuó mediante el método de Gunzler y Flohe (1985). En este ensayo la oxidación del dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato, (NADPH) es oxidado cuando el glutatión oxidado (GSSG) es reducido por la acción de la glutatión reductasa (GRed). La actividad enzimática fue expresada en nanomoles de NADPH/min/mg de proteína.

Se adicionaron 100 μL de sobrenadante en la celda de cuarzo, agregando 900 μL de solución buffer de reacción (50 mM de fosfato de potasio pH 7.0; 3.5 Mm de GSH, 1.0 mM de NaN_3 y 0.12 mM NADPH/1.0 mL), se adicionaron 8 μL de glutatión reductasa, además se colocaron 200 μL de H_2O_2 inmediatamente antes de la determinación de la absorbancia a 340 nm. Se registró la lectura inicial y otra a 1 minuto transcurrido. Se utilizó el $\text{CEM} = 6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para calcular el H_2O_2 degradado durante la reacción (Günzler & Flohé, 1985).

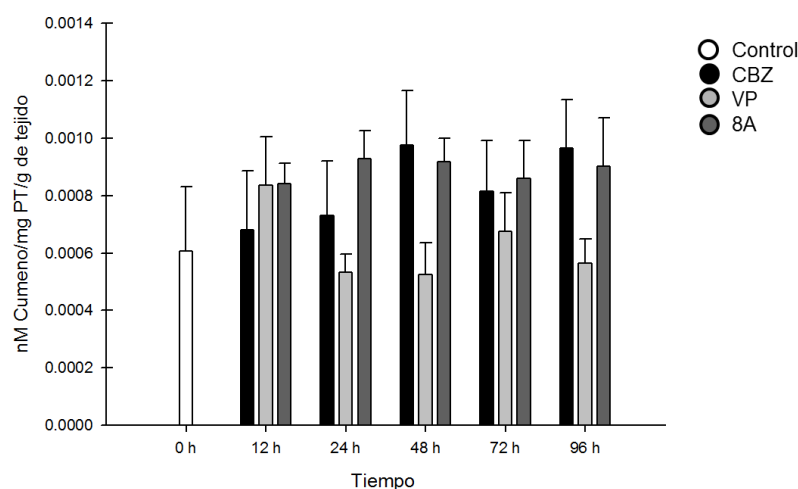
4.3. Análisis estadístico

Para la evaluación del estrés oxidativo, se realizó una ANOVA de una vía para grupos independientes por tratamiento. Los paquetes estadísticos manejados fueron STATISTICA 7, JMP 6 y SIGMA PLOT 10.0.

4.4. Resultados

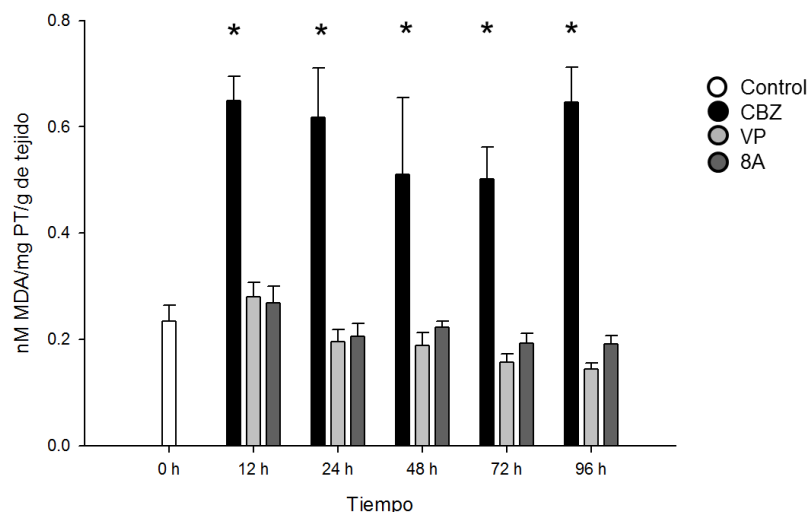
4.4.1. Evaluación del daño oxidativo en tejido cerebral de carpa

Para los hidroperóxidos (expresado como la concentración de cumeno en nM de cumeno/mg PT/g de tejido) no fue significativamente alterado por los tratamientos de CBZ ($F_{5, 42}=1.453$, $p=0.226$), VP ($F_{5, 45}=0.675$, $p=0.645$) y 8A ($F_{5, 48}=0.735$, $p=0.601$) con respecto al tiempo, sin embargo se observó que hay una elevación máxima de la concentración de cumeno en el cerebro de los organismos expuestos a CBZ a las 48 h (130 % más que en las 0 h de exposición), mientras que para los tratamientos VP y 8A, se observa un incremento del 38 % a las 12 h y 53 % a las 24 h (Gráfica 12).



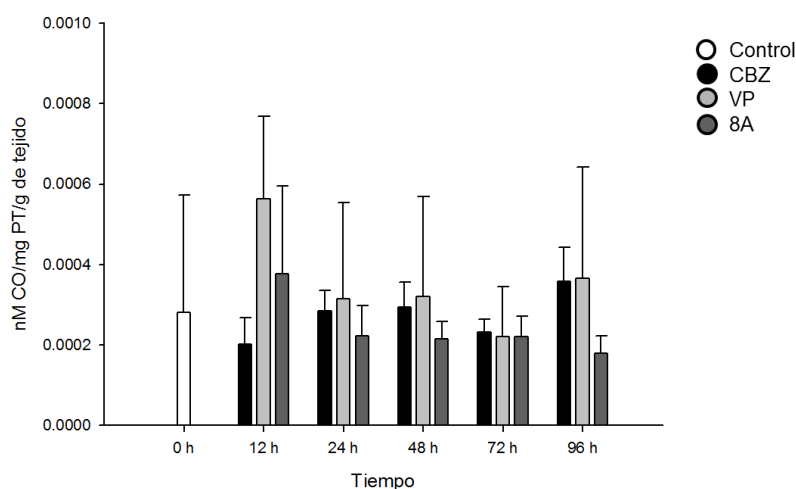
Gráfica 12. Contenido de hidroperóxidos en cerebro de carpas tratadas con CBZ, VP y 8A. Los valores expresados son las medias $\pm$ E.E. de nueve individuos.

Los lipoperóxidos de animales tratados con la concentración de CBZ incrementan significativamente en todos los tiempos de exposición con respecto al tiempo 0 con una incremento máximo (177 %) a las 48 h ($F_{5, 42}=5.624$, $p<0.001$). Por el contrario, el tratamiento de VP presentan diferencias significativas a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición con respecto a 12 h ($F_{5, 45}=4.286$, $p<0.01$). Finalmente, los individuos tratados con el compuesto 8A no presentan diferencias significativas con respecto a las 0 h ($F_{5, 47}=1.702$, $p=0.153$) (Gráfica 13).



Gráfica 13. Grado de lipoperoxidación en cerebro de carpas tratadas con CBZ, VP y 8A. Los valores son la media de nueve individuos $\pm$ E.E. * Indica una diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.01$).

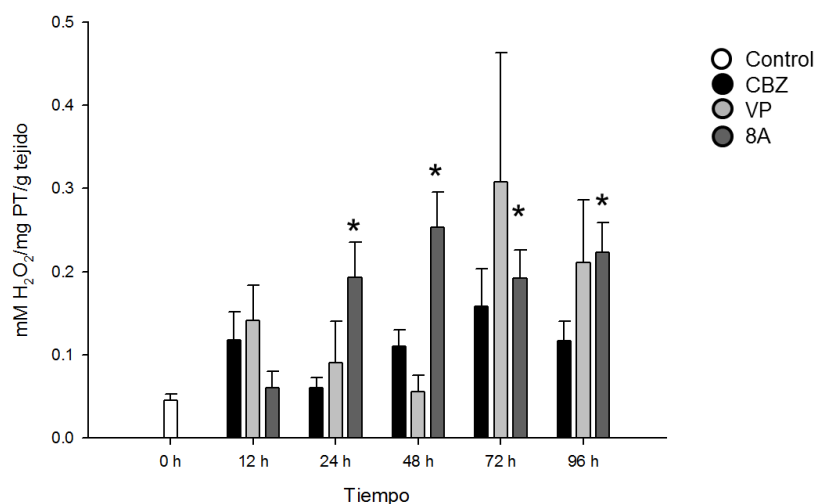
En la Gráfica 14 se muestra que no existen diferencias significativas en la concentración de proteínas oxidadas en los tratamientos respecto a los tiempos de exposición, habiendo elevaciones máximas de 14 % en CBZ ($F_{5, 44} = 0.667$, $p = 0.651$) a las 96 h y 101 % en VP ($F_{5, 45} = 0.248$, $p = 0.939$) a las 12 h en relación al tiempo 0 h, Por otra parte, el grupo 8A presenta una reducción de proteínas oxidadas comparada al tiempo 0, sin haber diferencias estadísticas ($F_{5, 35} = 0.664$, $p = 0.653$).



Gráfica 14. Contenido de proteínas oxidadas en cerebro de carpas tratadas con CBZ, VP y 8A. Los valores son la media de nueve individuos $\pm$ E.E.

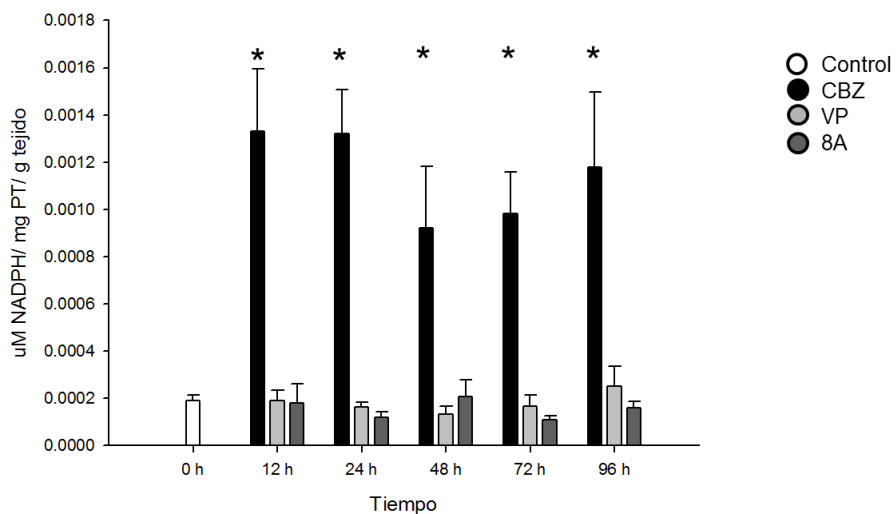
4.4.2. Evaluación de la actividad antioxidante en tejido cerebral de carpa

La actividad de CAT muestra que no existen diferencias en los tratamientos de CBZ ($F_{5, 46}=2.244$, $p=0.066$) y VP ($F_{5, 42}=2.131$, $p=0.08$), sin embargo, existen diferencias entre los distintos tiempos de exposición de 8A con respecto a 0 h ($F_{5, 47}=6.532$, $p<0.001$), con un incremento máximo a las 72 h en CBZ (245 %), a las 72 h en VP (572 %) y a las 48 h en 8A (452 %) como se observa en la Gráfica 15.



Gráfica 15. Actividad de CAT en cerebro de carpas tratadas con CBZ, VP y 8A. Los valores son la media de nueve individuos $\pm$ E.E. * Indica una diferencia significativa con respecto al control ($p<0.001$).

La Gráfica 16 muestra la actividad de Gpx, donde existen diferencias significativas en el tratamiento de CBZ ($F_{5, 43}=3.834$, $p<0.01$), al incrementarse la actividad enzimática con respecto a las 0 h (593 %), mientras que VP ($F_{5, 46}=0.695$, $p=0.63$) y 8A ($F_{5, 45}=0.599$, $p=0.70$) no presentaron diferencias significativas, con una reducción de la actividad enzimática a las 48 h (30 %) y 72 h (7 %), respectivamente.



Gráfica 16. Actividad de Gpx en cerebro de carpas tratadas con CBZ, VP y 8A. Los valores son la media de nueve individuos $\pm$ E.E. * Indica una diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.01$).

4.5. Discusión

Diversos estudios han comprobado que los fármacos producen cambios en el balance de las EOR y la maquinaria enzimática antioxidante en órganos de carpas expuestas a concentraciones ambientales, lo que genera estrés oxidativo (Islas-Flores *et al.*, 2013, 2014). Si bien los fármacos producen cambios bioquímicos o fisiológicos con la finalidad de producir un efecto benéfico, el consumo prolongado de estos pudiera alterar la homeostasis celular provocando un daño mayor. El estrés oxidativo en células del sistema nervioso central es de especial atención, ya que ha sido relacionado a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson y esclerosis, por lo que la evaluación de nuevos compuestos psicoactivos a este nivel es relevante; más aún en compuestos que se destinan al tratamiento de la epilepsia, debido a que esta enfermedad por sí misma, produce grandes cantidades de EOR, lo que puede llevar a falla mitocondrial y posterior muerte celular (Wolfe *et al.*, 1998; Patel, 2002; Rivas-Arancibia *et al.*, 2011). En cuanto a los ensayos de daño oxidativo en tejido cerebral se observó que la concentración de Lpx aumento en más de 300 % con respecto al testigo en el tratamiento con CBZ, lo que concuerda con estudios que demuestran que este fármaco aumenta la concentración de estas especies oxidadas (Thaakur Santhrani, 2012). Para el caso de VP, se observa un decremento de Lpx, lo que concuerda con estudios realizados en cultivos neuronales, donde se observa un efecto protector por parte del fármaco, debido al incremento en la expresión de la proteína del estrés del retículo endoplásmico GRP78 y el factor antiapoptótico bcl-2 en células de la corteza cerebral de rata (Vajda, 2002; Wang *et al.*, 2003). Por otra parte, en pacientes que consumían dicho fármaco, y que su estatus oxidante era mucho más equilibrado que los tratados con CBZ (Aycicek & Iscan, 2007; Peker *et al.*, 2009). Para el compuesto 8A las concentraciones de Lpx responden de manera similar a VP, por lo que se asume que favorece el equilibrio de EOR.

En el contenido de proteínas oxidadas, solo mostró una disminución en relación al testigo (0 h) en el tratamiento con 8A. Este tipo de moléculas se presentan por la oxidación de proteínas funcionales en la célula, y que una vez oxidadas pueden generar cascadas de segundos mensajeros que pueden inducir la muerte celular por apoptosis (England *et al.*, 2004, 2006). Esto nos hace suponer que el compuesto no se une a dichas proteínas lo que reduce la formación de Pox, con respecto a VP y CBZ.

Con respecto a las enzimas antioxidantes se determinó la actividad de CAT y Gpx. En la actividad enzimática de CAT, se observa una reducción de la actividad en el grupo CBZ,

lo que corresponde con otros estudios en humanos sometidos a tratamientos con este fármaco y VP. La actividad de Gpx es aproximadamente seiscientas veces mayor en el grupo CBZ con respecto al testigo y a los tratamientos de VP y 8A, lo que corresponde con la concentración de Lpx, esto es, que concentraciones elevadas de los últimos incrementaran la actividad de Gpx, ya que actúa directamente sobre los lípidos peroxidados (Gaté *et al.*, 1999; Bagnyukova *et al.*, 2006; Islas-Flores *et al.*, 2013).

La participación del estrés oxidativo en alteraciones metabólicas del SNC está bien establecido, ya que el cerebro es muy sensible al daño oxidativo por contener una gran cantidad de ácidos grasos fácilmente oxidables y un sistema de defensa limitado (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

El compuesto 8A presenta eficacia anticonvulsiva en la dosis de 20.9 μmol , comparable al efecto de CLZ en una dosis de 15.83 μmol en ratones macho de la cepa CD1, lo que coincide con el trabajo previo en ratas Wistar.

El compuesto 7A presenta baja eficacia anticonvulsiva en las dosis de 15.83 y 22.4 μmol , con respecto a CBZ, CLZ y el compuesto 8A en ratones macho de la cepa CD1.

Los compuestos sintetizados no tienen potencial embriotóxico en comparación con CLZ, CBZ y VP en embriones de pez cebra.

La exposición de carpas al compuesto 8A no altera los biomarcadores de daño oxidativo, y aumenta la actividad de CAT con respecto al control, lo que se traduce en menor estrés oxidante en tejido cerebral.

PERSPECTIVAS

Evaluar el potencial anticonvulsivo de 7A a dosis mayores a las empleadas en este estudio (más de 45 mg/Kg de compuesto), utilizando la inducción de convulsiones con PTZ, así como en otros modelos propuestos para la inducción de crisis convulsivas (máximo electrochoque, ácido kaínico, bicuculina) sustentando el mecanismo de acción propuesto sobre el sistema GABAérgico. Posteriormente, se debe determinar el potencial embriotóxico de ambos compuestos en un modelo murino, y comparar dichos resultados con lo reportado para CBZ, VP y CLZ, con la finalidad de corroborar que 7A y 8A son menos tóxicos. Finalmente, se debe evaluar la inducción de estrés oxidativo por parte de 7A y 8A respecto a CBZ, VP y CLZ en cerebro de ratones CD1.

PRODUCTOS

TESIS DIRIGIDAS

Título de la Tesis	Nombre del Alumno	Programa académico	Fecha
Evaluación del posible daño oxidativo causado por la exposición a dimetilsulfóxido (DMSO) en hígado y branquia de carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	Mayra Alejandra Castillo Ibars	Licenciatura en Química Clínica	11 de junio de 2015
Efecto del extracto de <i>Cynara scolymus</i> sobre la concentración de glucosa post-prandial en ratas hembra sanas ovariectomizadas de la cepa Wistar	Rogelio Aguayo Nava	Licenciatura en Química Clínica	12 de diciembre de 2013
Síntesis, caracterización y evaluación del posible efecto ansiolítico del ácido 3-(1-benzimidazol-2-il) propanoico en un modelo de ansiedad en vertebrados utilizando pez cebra macho (<i>Danio rerio</i>)	Alberto Feliciano Carmona	Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica	22 de junio de 2012
Síntesis y evaluación del posible efecto antifúngico de un derivado de benzimidazol en una cepa de <i>Candida albicans</i> .	Heydi Ericka García Mancilla	Licenciatura en Química Clínica	5 de diciembre de 2012

ARTÍCULOS PUBLICADOS

FR. Ramos-Morales, J. Correa-Basurto, M. Saavedra-Vélez, ME. Acosta-Hernández, **E. Gasca-Pérez**, A. Pérez-Palacios, J. Trujillo-Ferrara. Modelo PTZ: un screening primario para el desarrollo de nuevas moléculas con actividad anticonvulsivante, en la revista indexada Archivos de Neurociencias, ISSN 0187-4705. 2012. 17(1):45-48

Mario E. Acosta-Hernández, **Eloy Gasca-Pérez**, Fernando R. Ramos-Morales, Rosa V. García -Rodríguez, Francisco Solís-Páez, Gabriela Evaristo-Portilla. Abraham H. Soto-Cid. **Factores, causas y perspectiva de la obesidad infantil en México**, en la revista indexada Revista Médicas UIS, ISSN 0121-0319. 2013. 2b(1):59-68

Margarita Virginia Saavedra-Vélez, José Correa-Basurto, Myrna H. Matus, **Eloy Gasca-Pérez**, Martiniano Bello, Roberto Cuevas-Hernández, Rosa Virginia García-Rodríguez, José Trujillo-Ferrara, Fernando Rafael Ramos-Morales. **Seeking potential anticonvulsants agents that target GABAA receptor using experimental a theoretical procedures**, en la revista indexada Journal of Computer-Aided Molecular Design, ISSN 0920-654X (impreso), 1573-4951 (Web). 2014. 28(12):1217-32

Acosta-Hernández ME., Lozada-Sosa MC., **Gasca-Pérez E.**, Ramos-Morales FR., Croda-Todd MT., Escobar-Henríquez JBH., López-Muñoz JJD., Ortega-Planell CB., Cuevas-Hernández RI. **Hormonas del eje intestino-cerebro como sistema regulador del peso corporal y su relación con la obesidad**, en la Revista Electrónica Medicina, Salud y Sociedad, ISSN 2007-2007. 2015. 5(3):280-95

Gasca-Pérez E., Galar-Martínez M., Ramos-M.F.R., Pérez-Cóyotl I., García-Medina S., Gómez-Oliván L.M. **Estrés Oxidativo Causado por la Exposición a Carbamazepina en Cerebro de carpa común (Cyprinus carpio)**, en la revista indexada Revista Latinoamericana el Ambiente y la Ciencias, ISSN 2007-512X. 2015. 6(12):1161-65

Ramos López J., Valdés Martínez J. I., Galar-Martínez M., **Gasca-Pérez E.**, Martínez-Galero E., Gómez-Oliván L. **Embriotoxicidad producida por Mercurio y**

Aluminio sobre pez cebra (*Danio rerio*), en la revista indexada Revista Latinoamericana el Ambiente y la Ciencias, ISSN 2007-512X. 2015. 6(12):2720-23

Mario Eduardo Acosta Hernández, Fernando Rafael Ramos Morales, José Bernardo Héctor Escobar Henríquez, José de Jesús Daniel López Muñoz, Pamela Escobar Castillo, Rosa Virginia García Rodríguez, Claudia Belén Ortega Planell, María Teresa Croda-Todd, **Eloy Gasca Pérez. Mecanismos bioquímicos de la Leptina implicados en el Desarrollo de la Obesidad** en la Revista Médica de la Universidad Veracruzana (ISSN 18703267) y que será publicado en el volumen 2 de 2015.

Redacción del artículo de investigación **Embryotoxicity Assessment of Three Anticonvulsants Drugs and Two Novel Structural Benzodiazepines Analogues in Zebrafish Model**, que se encuentra en revisión.

Redacción del artículo de investigación **Oxidative stress induced by exposure to carbamazepine, valproate and benzodiazepine analogue in brain tissue of common carp (*Cyprinus carpio*)**, que se encuentra en revisión.

CONGRESOS

Ponencia oral titulada **Estrés Oxidativo Causado por la Exposición a Carbamazepina en Cerebro de carpa común (*Cyprinus carpio*)**, en el XIV Congreso Internacional y XX Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, realizado del 3 al 5 de junio del 2015, en Puebla, Puebla.

Presentación del cartel **Embriotoxicidad producida por Mercurio y Aluminio sobre pez cebra (*Danio rerio*)**, en el XIV Congreso Internacional y XX Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, realizado del 3 al 5 de junio del 2015, en Puebla, Puebla, México.

Presentación del cartel **Effect of three neuroactive compounds exposure on brain of common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers**, en el SETAC North America 36th Annual Meeting, realizado del 1 al 5 de noviembre del 2015, en Salt Lake City, Utah, EUA.

ANEXO 1

Síntesis y caracterización

Obtención de la dibenzo(b,f)(1,4)diazocin-6,11(5H,12H)-diona (8A)

Se sintetizó a partir de la mezcla de 3.24 g de *o*-fenilendiamina (0.03 mol) y 6.66 g (0.03 mol) de dietilftalato en 60 mL de tetrahidrofurano seco con 2.9 g (0.06 mol) de hidruro de sodio en aceite de dispersión al 60 %. La mezcla fue llevada a agitación a temperatura ambiente hasta el inicio de una reacción vigorosa, la mezcla fue llevada a enfriamiento con hielo y agitación por 12 h, seguida por una breve agitación a temperatura ambiente. La solución resultante fue diluida con 50 mL de agua destilada y acidificada con una solución de ácido clorhídrico al 50 %, el sólido formado por precipitación fue filtrado y lavado con etanol y benceno. Los cristales lavados son llevados a estufa a 80 °C por 12 h para secarlos. La reacción se representa en la Figura A1 (Paudler & Zeiler, 1969; Venugopalan *et al.*, 1985).

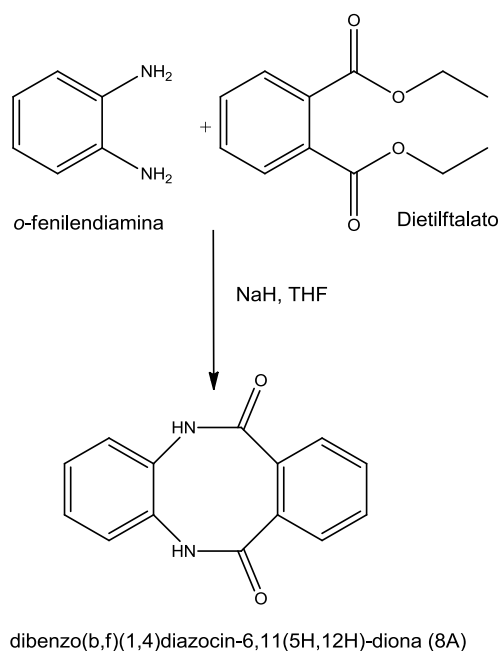


Figura A1. Esquema de la reacción propuesta por Paudler y Zeiler

En la obtención de la dibenzo(*b,f*)(1,4)diazocin-6,11(5H,12H)-diona se observó que al agregar la *o*-fenilendiamina, el dietilftalato, y el hidruro de sodio al tetrahidrofurano iniciaba una reacción exotérmica con un cambio de color de arena a café, con lo cual se llevó a agitación en hielo por 12 horas hasta obtener una solución oscura que fue diluida gota a gota con agua generando gas, acto seguido se aciduló la mezcla con solución de ácido

clorhídrico al 50 % generando dos fases, y en medio de estas se formó un precipitado blanco, este fue filtrado, lavado, secado en estufa y recrystalizado en dimetilformamida, los cristales resultantes fueron filtrados y secados. Posteriormente se realizó punto de fusión resultando en 288 °C (ref 1. pf. 301-303 °C; ref 2. pf. 270-272 °C), para corroborar si el compuesto sintetizado era el correcto se realizó una inyección en el cromatógrafo de gases, RMN ^1H y ^{13}C (Figura A2, Figura A3 y Figura A4). ^1H (DMSO- d_6) δ 7.17 (dd, 4H, C1, C2, C3, C4, $J^4=4.4$; $J^3=7.15$), 7.30 (dd, 2H, C8, C9, $J^4=3.02$; $J^3=9.07$), 7.41 (dd, 2H, C7, C10, $J^4=3.30$; $J^3=9.07$), 10.2 (s, 2H, N). ^{13}C (DMSO- d_6) δ 127.0 (s, C1, C4), 127.4 (s, C2, C3), 128.0 (s, C8, C9), 130.7 (s, C7, C10), 132.6 (s, C4a, C12a), 135.2 (s, C6a, C10a), 170.8 (s, C6, C11). GC-MS: Tr= 1.20 min; ion molecular=238.

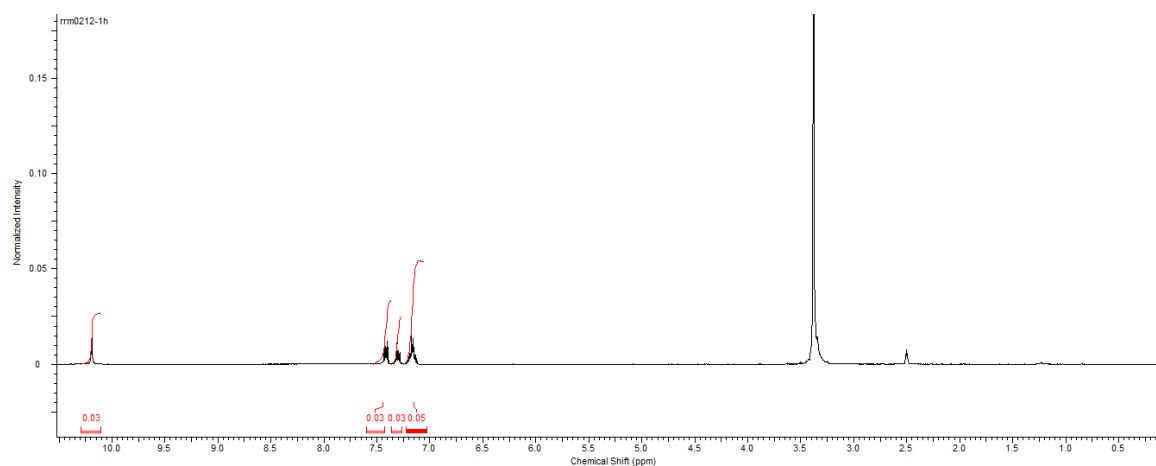


Figura A2. Espectro de ^1H RMN del compuesto dibenzo(*b,f*)(1,4)diazocin-6,11(5H,12H)-diona a 300 MHz en DMSO- d_6

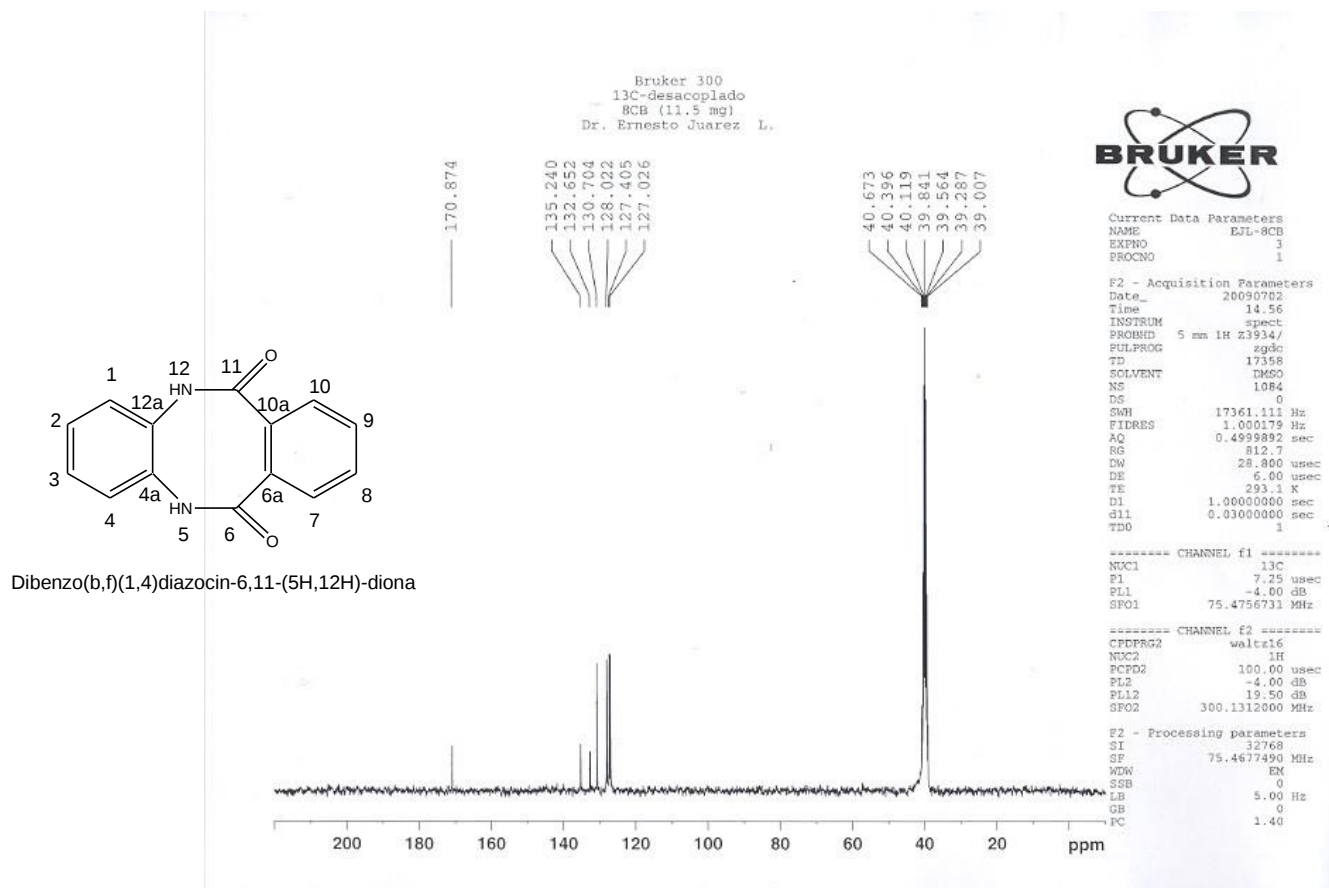
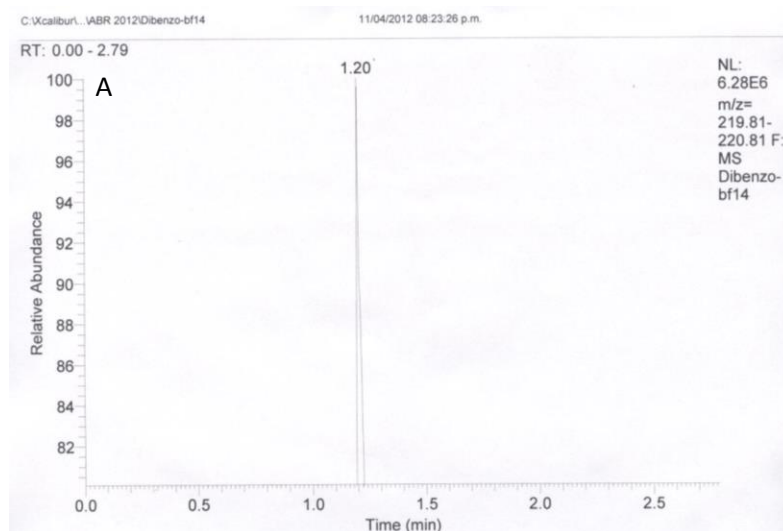


Figura A3. Espectro de ^{13}C RMN para el compuesto B1 a 75.47 MHz en DMSO- d_6



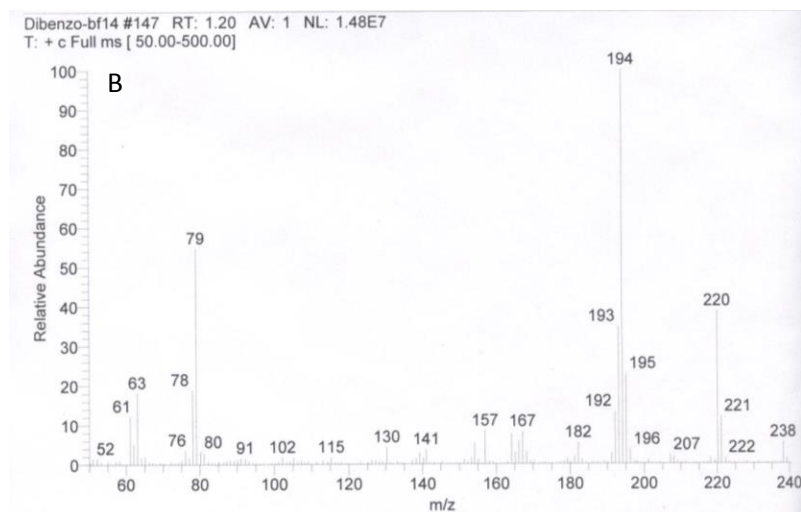


Figura A4. A) Cromatograma correspondiente a la dibenzodiazocina. B) Patrón de fragmentación donde se identifica el ion molecular.

Obtención del ácido 2-(fenilcarbamoil)benzoico

A partir de 1.86 g de anilina (20 mmol) y 2.96 g de anhídrido ftálico (20 mmol) en 60 mL de THF, la amina fue agregada en pequeñas porciones al anhídrido agitando entre cada adición. Al terminar de agregar el reactivo, la mezcla se llevó a agitación constante por 1 h a temperatura ambiente, después de este tiempo la mezcla fue concentrada en rotavapor, el sólido obtenido fue secado a 80 °C y recrystalizado en cloroformo obteniendo cristales blancos a los cuales se les determinó punto de fusión (Perry & Parveen, 2001).

Obtención de la 5H-dibenzo[b,e]azepin-6,11-diona (7A)

Posteriormente se sintetizó la 5H-dibenzo[b,e]azepin-6,11-diona tomando 2.41g(10mmol) del ácido 2-(fenilcarbamoil)benzoico y colocándolos en un matraz que contenía 10 ml de ácido acético y ácido propilfosfónico (PPA, obtenido a partir de 1 g de P₂O₅ y 0.3 mL de H₃PO₄). La mezcla fue llevada a agitación y calentamiento a 95 °C por 2 horas, enfriada a temperatura ambiente, vertida sobre hielo picado y dejada en reposo por otras 2 horas (Figura A5). El sólido obtenido fue filtrado, lavado con 50 mL de agua destilada y recrystalizado en ácido acético, obteniendo cristales blancos a los cuales se les realizó punto de fusión y placa cromatográfica en capa fina para determinar la presencia del compuesto (Jarikote *et al.*, 2004).

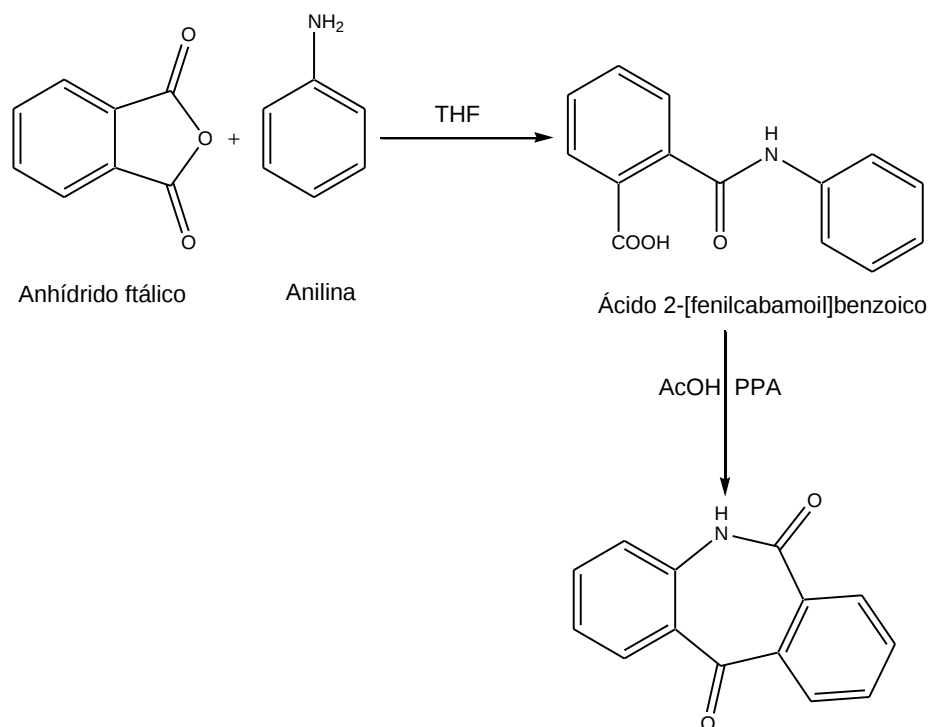


Figura A5. Esquema de reacción para obtener la 5H-dibenzo[b,e]azepin-6,11-diona (A1).

Los compuestos resultantes del proceso de síntesis fueron caracterizados de manera preliminar mediante cromatografía en capa fina confrontándolos con las materia primas y utilizando propiedades físicas como el punto de fusión. Después de la caracterización preliminar y solo en los casos que fueron necesarios se purificaron los productos mediante lavados con disolventes orgánicos y cristalización. La caracterización confirmatoria se realizó mediante técnicas espectroscópicas que incluyeron RMN ^1H y espectrometría de masas.

Posterior a la obtención del precursor se tomó 1 mmol de este y se colocó en un matraz que contenía una mezcla de 10 ml ácido acético y PPA, utilizada como catalizador, hecho esto, el matraz fue llevado a agitación y calentamiento a 95 °C dando una solución café oscuro que fue enfriada a temperatura ambiente. Una vez fría la solución que se tornó espesa fue vertida en hielo picado y dejada reposar dos horas obteniendo una masa café. Este producto fue lavado con 50 mL de agua destilada, filtrado y recrystalizado en ácido acético obteniendo cristales blancos que fueron filtrados y secados con ayuda de vacío. Se realizó punto de fusión obteniendo 210 °C, y se caracterizó mediante cromatografía en capa fina comparándolo con la materia prima. Para corroborar si el compuesto sintetizado era el correcto se realizó RMN ^1H (Figura A6). ^1H (Acetona- d_6) δ 7.44 (dd, 1H, C2 7.52;

$J^5 = 0.83$; $J^4 = 3.02$; $J^3 = 9.07$), 7.52 (m, 4H, C3, C4, C8, C9), 7.60 (dd, 1H, C5, $J^5 = 1.65$; $J^3 = 9.35$), 7.94 (ddd, 2H, C7, C10; $J^5 = 0.55$; $J^4 = 4.12$; $J^3 = 8.80$), 2.85 (s, 1H, NH). Cabe aclarar que este compuesto está reportado en la literatura, sin embargo la síntesis se realizó debido a la poca accesibilidad al compuesto por la vía comercial.

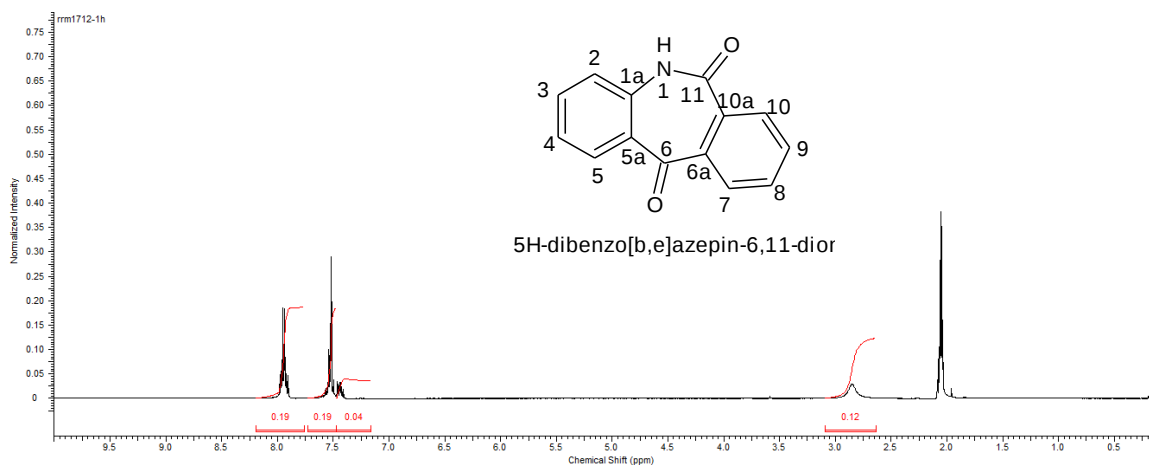


Figura A6. Espectro de ^1H RMN del compuesto a 300 MHz en $\text{Acetona-}d_6$.

REFERENCIAS

- Adkins, C.E., Pillai, G. V, Kerby, J., Bonnert, T.P., Haldon, C., McKernan, R.M., Gonzalez, J.E., Oades, K., Whiting, P.J., & Simpson, P.B. (2001) $\alpha 4\beta 3\delta$ GABA(A) receptors characterized by fluorescence resonance energy transfer-derived measurements of membrane potential. *J. Biol. Chem.*, **276**, 38934–38939.
- Andrade, R.J., Lucena, M.I., Aguilar, J., Lazo, M.D., Camargo, R., Moreno, P., García-Escañó, M.D., Marquez, A., Alcántara, R., & Alcáin, G. (2000) Chronic liver injury related to use of bentazepam: an unusual instance of benzodiazepine hepatotoxicity. *Dig. Dis. Sci.*, **45**, 1400–1404.
- Araújo, A.C., Nicotra, F., Airoidi, C., Costa, B., Giagnoni, G., Fumagalli, P., & Cipolla, L. (2008) Synthesis and Biological Evaluation of Novel Rigid 1,4-Benzodiazepine-2,5-dione Chimeric Scaffolds. *European J. Org. Chem.*, **2008**, 635–639.
- Ariza, S.Y., Rincón, J., & Guerrero, M.F. (2006) Efectos sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico y fracciones de *Hygrophila tytttha* Leonard. *Rev. Colomb. Ciencias Químico-Farmacéuticas*, **36**, 106–119.
- Ayala, G.F., Dichter, M., Gumnit, R.J., Matsumoto, H., & Spencer, W.A. (1973) Genesis of epileptic interictal spikes. New knowledge of cortical feedback systems suggests a neurophysiological explanation of brief paroxysms. *Brain Res.*, **52**, 1–17.
- Aycicek, A. & Iscan, A. (2007) The effects of carbamazepine, valproic acid and phenobarbital on the oxidative and antioxidative balance in epileptic children. *Eur. Neurol.*, **57**, 65–69.
- Bagnyukova, T. V, Chaharak, O.I., & Lushchak, V.I. (2006) Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat. Toxicol.*, **78**, 325–331.
- Barata, C., Varo, I., Navarro, J.C., Arun, S., & Porte, C. (2005) Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, **140**, 175–186.
- Barros, T.P., Alderton, W.K., Reynolds, H.M., Roach, A.G., & Berghmans, S. (2008) Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.*, **154**, 1400–1413.

- Bhat, M.A. & Al-Omar, M.A. (2011) Synthesis, characterization and in vivo anticonvulsant and neurotoxicity screening of Schiff bases of phthalimide. *Acta Pol. Pharm.*, **68**, 375–380.
- Birve, A., Neuwirth, C., Weber, M., Marklund, S.L., Nilsson, A.-C., Jonsson, P.A., & Andersen, P.M. (2010) A novel SOD1 splice site mutation associated with familial ALS revealed by SOD activity analysis. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 4201–4206.
- Bormann, J. (2000) The “ABC” of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 16–19.
- Bowery, N.G., Doble, A., Hill, D.R., Hudson, A.L., Shaw, J.S., Turnbull, M.J., & Warrington, R. (1981) Bicuculline-insensitive GABA receptors on peripheral autonomic nerve terminals. *Eur. J. Pharmacol.*, **71**, 53–70.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., & Klaminder, J. (2013) Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science*, **339**, 814–815.
- Bromfield, E.B., Cavazos, J.E., & Sirven, J.I. (2006) Basic Mechanisms Underlying Seizures and Epilepsy.
- Büege, J.A. & Aust, S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, **52**, 302–310.
- Bulach, R., Myles, P.S., & Russnak, M. (2005) Double-blind randomized controlled trial to determine extent of amnesia with midazolam given immediately before general anaesthesia. *Br. J. Anaesth.*, **94**, 300–305.
- Cárdenas-Rodríguez, N., Coballase-Urrutia, E., Rivera-Espinosa, L., Romero-Toledo, A., Sampieri, A.I., Ortega-Cuellar, D., Montesinos-Correa, H., Floriano-Sánchez, E., & Carmona-Aparicio, L. (2013) Modulation of Antioxidant Enzymatic Activities by Certain Antiepileptic Drugs (Valproic Acid, Oxcarbazepine, and Topiramate): Evidence in Humans and Experimental Models. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2013**, ID 598493, 8 pages.
- CCAC, C.C.C. on A. (2005) *Guidelines on: The Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing*. Canadian Council on Animal Care, Ottawa, Canada, Canada.

- CDC (2014) Epilepsy: Data and Statistics. [WWW Document]. <http://www.cdc.gov/epilepsy/>,.
- Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M., Angeletti, M., Eleuteri, A.M., & Keller, J.N. (2007) Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, **1773**, 93–104.
- Chen, J., Patel, R., Friedman, T.C., & Jones, K.S. (2010) The Behavioral and Pharmacological Actions of NMDA Receptor Antagonism are Conserved in Zebrafish Larvae. *Int. J. Comp. Psychol.*, **23**, 82–90.
- Chupakhin, V.I., Palyulin, V.A., & Zefirov, N.S. (2006) Modeling the open and closed forms of GABAA receptor: analysis of ligand-receptor interactions for the GABA-binding site. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **408**, 169–174.
- Circu, M., & Aw, T.Y. (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.*, **48**, 749–762.
- Cole, L.K. & Ross, L.S. (2001) Apoptosis in the developing zebrafish embryo. *Dev. Biol.*, **240**, 123–142.
- Cooper, J.R. & Roth, R.H. (2003) *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*.
- Cresta, L. (2001) Prospecto de envase. Rivotril, Clonacepam, Roche. Adaptado a la disposición A. N. M. A. T.-5904/96.
- Cunliffe, V.T. (2004) Histone deacetylase 1 is required to repress Notch target gene expression during zebrafish neurogenesis and to maintain the production of motoneurons in response to hedgehog signalling. *Development*, **131**, 2983–2995.
- Deavall, D.G., Martin, E.A., Horner, J.M., & Roberts, R. (2012) Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *J. Toxicol.*, **ID 645460**, 13.
- Deng, X.-Q., Quan, L.-N., Song, M.-X., Wei, C.-X., & Quan, Z.-S. (2011) Synthesis and anticonvulsant activity of 7-phenyl-6,7-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-5(4H)-ones and their derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **46**, 2955–2963.
- Deng, X.-Q., Wei, C.-X., Li, F.-N., Sun, Z.-G., & Quan, Z.-S. (2010) Design and synthesis of 10-alkoxy-5, 6-dihydro-triazolo[4,3-d]benzo[f][1,4]oxazepine derivatives with anticonvulsant activity. *Eur. J. Med. Chem.*, **45**, 3080–3086.
- Devlin, R.J. & Henry, J.A. (2008) Clinical review: Major consequences of illicit drug consumption. *Crit. Care*, **12**, 202.

- Duncan, G.W., Lyster, S.C., & Wright, J.B. (1965) Reproductive mechanisms influenced by a diazocine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **120**, 725–728.
- Eimon, P.M. & Rubinstein, A.L. (2009) The use of in vivo zebrafish assays in drug toxicity screening. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **5**, 393–401.
- Engel, J. (2006) ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy Res.*, **70 Suppl 1**, S5–S10.
- Engel, J. & Pedley, T. (1997) *Epilepsy: A Comprehensive Textbook.*, 2nd edn. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA.
- England, K., Driscoll, C.O., & Cotter, T.G. (2006) ROS and protein oxidation in early stages of cytotoxic drug induced apoptosis. *Free Radic. Res.*, **40**, 1124–1137.
- England, K., O'Driscoll, C., & Cotter, T.G. (2004) Carbonylation of glycolytic proteins is a key response to drug-induced oxidative stress and apoptosis. *Cell Death Differ.*, **11**, 252–260.
- Enna, S. & Coyle, J. (1998) *Pharmacological Management of Neurological and Psychiatric Disorders*, 1st edn. McGraw-Hill Medical, New York.
- Enna, S.J. & Möhler, H. (2007) *The GABA Receptors*, The Receptors. Humana Press, Totowa, NJ.
- FAO (2014) Programa de información de especies acuáticas *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) [WWW Document]. *Dep. Pesca y Acuacultura.*, URL http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/es
- Fattman, C.L., Schaefer, L.M., & Oury, T.D. (2003) Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic. Biol. Med.*, **35**, 236–256.
- Figueroa Duarte, A.S. & Campell Araujo, Ó.A. (2004) Aspectos psicosociales de la epilepsia. *Arch. neurociencias (México, D.F.)*, **9**, 135–142.
- Fisher, R.S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J.H., Elger, C.E., Engel, J., Forsgren, L., French, J.A., Glynn, M., Hesdorffer, D.C., Lee, B.I., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Perucca, E., Scheffer, I.E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014) ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, **55**, 475–482.
- Fisher, R.S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J. (2005) Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, **46**, 470–472.

- Focella, A. & Rachlin, A.I. (1967) Ammonolysis of 2-halo-2'-benzoyl-4'-nitroacetanilides.
- Fukasawa, T., Suzuki, A., & Otani, K. (2007) Effects of genetic polymorphism of cytochrome P450 enzymes on the pharmacokinetics of benzodiazepines. *J. Clin. Pharm. Ther.*, **32**, 333–341.
- Gasca, E., Ramos, F.R., Correa, J., Saavedra, M., & Cruz, J.S. (2010) Estudio teórico por acercamiento molecular de algunas benzodiazocinas y benzazepinas al receptor GABA_A. Evaluación del posible efecto anticonvulsivante de la dibenzo(b,f)(1,4)diazocin-6,11(5h,12h)-diona. Memorias del I Congreso Internacional de Docencia e Investigación en Química 2010-México, Mexico, DF, pp. 1199–1211.
- Gaté, L., Paul, J., Ba, G.N., Tew, K.D., & Tapiero, H. (1999) Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed. Pharmacother.*, **53**, 169–180.
- Gay, C., Collins, J., & Gebicki, J.M. (1999) Hydroperoxide assay with the ferric-xylanol orange complex. *Anal. Biochem.*, **273**, 149–155.
- Gómez-Oliván, L.M. (2012) Oxidative stress in brickmakers of Juárez City, Chihuahua, México: Case-control study. *Adv. Biosci. Biotechnol.*, **03**, 1051–1059.
- Góth, L., Rass, P., & Páy, A. (2004) Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Mol. Diagn.*, **8**, 141–149.
- Graham Solomons, T.W. (2004) *Fundamentos de Química Orgánica*. Limusa.
- Günzler, A. & Flohé, L. (1985) Glutathione peroxidase. In Greenwald, R.A. (ed), *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press; 1 edition, Boca Raton, Florida, USA, pp. 285–290.
- Hanson, S.M., Morlock, E. V, Satyshur, K.A., & Czajkowski, C. (2008) Structural requirements for eszopiclone and zolpidem binding to the gamma-aminobutyric acid type-A (GABA_A) receptor are different. *J. Med. Chem.*, **51**, 7243–7252.
- Hermesen, S.A.B., van den Brandhof, E.-J., van der Ven, L.T.M., & Piersma, A.H. (2011) Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies. *Toxicol. In Vitro*, **25**, 745–753.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., & Peterson, R.E. (2005) Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol. Sci.*, **86**, 6–19.

- Hill, D.S., Wlodarczyk, B.J., Palacios, A.M., & Finnell, R.H. (2010) Teratogenic effects of antiepileptic drugs. *Expert Rev. Neurother.*, **10**, 943–959.
- Höjer, J., Baehrendtz, S., & Gustafsson, L. (1989) Benzodiazepine poisoning: experience of 702 admissions to an intensive care unit during a 14-year period. *J. Intern. Med.*, **226**, 117–122.
- ILAE (2012) The NIH/NINDS Anticonvulsant Screening Program (ASP): recommendations from the working group's 2012 review of the Program. *Epilepsia*, **53**, 1837–1839.
- Imler, M., Chabrier, G., Cherfan, J., & Simon, C. (1987) [Hepatitis caused by thiophene]. *Gastroentérologie Clin. Biol.*, **11**, 173–174.
- IRAC, I.R.A.C. (1985) *U.S. Government Principles for Utilization and Care of Vertebrate Animals Used in Testing, Research, and Training. Federal Register, May 20, 1985. Office of Science and Technology Policy. Washington, D.C. USA.*
- Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., Colín-Cruz, A., Neri-Cruz, N., & García-Medina, S. (2013) Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **92**, 32–38.
- Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Neri-Cruz, N., & Dublán-García, O. (2014) Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **21**, 5157–5166.
- Jarikote, D. V., Pawar, V.G., Bhusare, S.R., Hangarge, R. V., Vibhute, Y.B., & Pawar, R.P. (2004) A Facile Synthesis of 1,3,4,6-Tetrahydro-1,6-benzodiazocine-2,5-diones. *Russ. J. Org. Chem.*, **40**, 575–577.
- Karkos, J. (1991) [The neurotoxicity of benzodiazepines]. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.*, **59**, 498–520.
- Khera, K.S. (1992) A morphologic basis postulated for valproic acid's embryotoxic action in rats. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, **12**, 277–289.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., & Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.*, **203**, 253–310.
- Kushwaha, N., Saini, R.K., & Kushwaha, S.K.S. (2011) Synthesis of some Amide derivatives and their Biological activity. *Int. J. ChemTech Res.*, **3**, 203–209.

- Laegreid, L., Olegård, R., Walström, J., & Conradi, N. (1989) Teratogenic effects of benzodiazepine use during pregnancy. *J. Pediatr.*, **114**, 126–131.
- Lampen, A., Göttlicher, M., & Nau, H. (2001) Prediction of embryotoxic effects of valproic acid-derivatives with molecular in vitro methods. *ALTEX*, **18**, 123–126.
- Lange, M., Gebauer, W., Markl, J., & Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. *Chemosphere*, **30**, 2087–2102.
- Lebovitz, R.M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J., Dionne, L., Lu, N., Huang, S., & Matzuk, M.M. (1996) Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 9782–9787.
- Lee, S.H., Kang, J.W., Lin, T., Lee, J.E., & Jin, D. II (2013) Teratogenic potential of antiepileptic drugs in the zebrafish model. *Biomed Res. Int.*, **2013**, 726478.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., & Shacter, E. (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, **233**, 346–357.
- Lin, A.E., Peller, A.J., Westgate, M.-N., Houde, K., Franz, A., & Holmes, L.B. (2004) Clonazepam use in pregnancy and the risk of malformations. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.*, **70**, 534–536.
- Lubos, E., Loscalzo, J., & Handy, D.E. (2011) Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.*, **15**, 1957–1997.
- Mantovani, A. & Calamandrei, G. (2001) Delayed developmental effects following prenatal exposure to drugs. *Curr. Pharm. Des.*, **7**, 859–880.
- Martínez Juárez, I.E., López Zapata, R., Gómez Farías, B., Bravo Armenta, E., Romero Ocampo, L., Estévez Cruz, Z., Hernández de la Cruz, G., & Morán Molina, S. (2012) Epilepsia farmacorresistente: uso de la nueva definición y factores de riesgo relacionados. Estudio en población mexicana de un centro de tercer nivel. *Rev. Neurol.*, **54**, 159–166.
- Mas Bagà, M. (2006) Farmacología básica del valproato. Revisión tras 35 años de uso clínico para el tratamiento de la epilepsia. *RET. Rev. Toxicom.*, **47**, 11–33.
- Mayden, R.L., Tang, K.L., Conway, K.W., Freyhof, J., Chamberlain, S., Haskins, M., Schneider, L., Sudkamp, M., Wood, R.M., Agnew, M., Bufalino, A., Sulaiman, Z., Miya, M., Saitoh, K., & He, S. (2007) Phylogenetic relationships of *Danio* within the order Cypriniformes: a framework for comparative and

- evolutionary studies of a model species. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.*, **308**, 642–654.
- McElhatton, P.R. (1994) The effects of benzodiazepine use during pregnancy and lactation. *Reprod. Toxicol.*, **8**, 461–475.
- McKernan, R.M., Rosahl, T.W., Reynolds, D.S., Sur, C., Wafford, K.A., Atack, J.R., Farrar, S., Myers, J., Cook, G., Ferris, P., Garrett, L., Bristow, L., Marshall, G., Macaulay, A., Brown, N., Howell, O., Moore, K.W., Carling, R.W., Street, L.J., Castro, J.L., Ragan, C.I., Dawson, G.R., & Whiting, P.J. (2000) Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nat. Neurosci.*, **3**, 587–592.
- Medel Matus, J.S., Cortijo Palacios, L.X., Gasca Pérez, E., SusanTepetlan, P.V., Pérez Palacios, A., & Ramos Morales, F.R. (2011) Receptor GABAA: implicaciones farmacológicas a nivel central. *Arch. neurociencias (México, D.F.)*, **16**, 40–45.
- Mercolini, L., Mandrioli, R., Amore, M., & Raggi, M.A. (2008) Separation and HPLC analysis of 15 benzodiazepines in human plasma. *J. Sep. Sci.*, **31**, 2619–2626.
- Merrit, H. & Putnam, T. (1938) A NEW SERIES OF ANTICONVULSANT DRUGS TESTED BY EXPERIMENTS ON ANIMALS. *Arch. Neurol. Psychiatry*, **39**, 1003.
- Miao, L. & St Clair, D.K. (2009) Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic. Biol. Med.*, **47**, 344–356.
- Migliara, O., Plescia, S., Diana, P., Stefano, V. Di, Camarda, L., & Dall’Olio, R. (2004) Synthesis and pharmacological evaluation of 7-substituted 1-ethyl-3,4,10-trimethyl-1,10-dihydro-11H-pyrazolo[3,4-c][1,6]benzodiazocin-11-one. A new ring system. *ARQUIVOC*, **v**, 44–53.
- Migliara, O., Spanò, V., Parrino, B., Ciancimino, C., & Diana, P. (2012) Synthesis of pyrazolo[4,3-c][1,2,6]benzothiadiazocine, a new ring system as potential COX inhibitor. *ARQUIVOC*, **ii**, 41–49.
- Nau, H., Zierer, R., Spielmann, H., Neubert, D., & Gansau, C. (1981) A new model for embryotoxicity testing: teratogenicity and pharmacokinetics of valproic acid following constant-rate administration in the mouse using human therapeutic drug and metabolite concentrations. *Life Sci.*, **29**, 2803–2813.
- Negron, J.F. & Lockshin, R.A. (2004) Activation of apoptosis and caspase-3 in zebrafish early gastrulae. *Dev. Dyn.*, **231**, 161–170.

- NIH (2014) Anticonvulsant Screening Program [WWW Document]. URL <http://www.ninds.nih.gov/research/asp/>
- NOM-062-ZOO (1999) Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Nordt, S.P. & Clark, R.F. Midazolam: a review of therapeutic uses and toxicity. *J. Emerg. Med.*, **15**, 357–365.
- Oberley, L.W. (2005) Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed. Pharmacother.*, **59**, 143–148.
- Panayiotopoulos, C.P. (2012) The new ILAE report on terminology and concepts for the organization of epilepsies: Critical review and contribution. *Epilepsia*, **53**, 399–404.
- Patel, M.N. (2002) Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Epilepsy. *Free Radic. Res.*, **36**, 1139–1146.
- Paudler, W.W. & Zeiler, A.G. (1969) Diazocine chemistry. V. Synthesis and rearrangement of dibenzo[b,f] [1,4]diazocine-6,11(5H,12H)-dione. *J. Org. Chem.*, **34**, 2138–2140.
- Peker, E., Oktar, S., Ari, M., Kozan, R., Doğan, M., Cağan, E., & Söğüt, S. (2009) Nitric oxide, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme levels in epileptic children using valproic acid. *Brain Res.*, **1297**, 194–197.
- Perry, C.J. & Parveen, Z. (2001) The cyclisation of substituted phthalanilic acids in acetic acid solution. A kinetic study of substituted N-phenylphthalimide formation. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 512–521.
- Pettersson, B., Bergman, J., & Svensson, P.H. (2013) Synthetic studies towards 1,5-benzodiazocines. *Tetrahedron*, **69**, 2647–2654.
- Piao, F.-Y., Han, R.-B., Zhang, W., Zhang, W.-B., & Jiang, R.-S. (2011) Synthesis and anticonvulsant activity of 8-alkoxy-5,6-dihydro-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1]benzazepin-1-one derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **46**, 1050–1055.
- Pillai, R., Coverdale, L.E., Dubey, G., & Martin, C.C. (2004) Histone deacetylase 1 (HDAC-1) required for the normal formation of craniofacial cartilage and pectoral fins of the zebrafish. *Dev. Dyn.*, **231**, 647–654.
- Pirnay, S.O., Mégarbane, B., Borron, S.W., Risède, P., Monier, C., Ricordel, I., & Baud, F.J. (2008) Effects of various combinations of benzodiazepines with buprenorphine on arterial blood gases in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **103**, 228–239.

- Pitkänen, A., Schwartzkroin, P., & Moshé, S. (2006) *Models of Seizures and Epilepsy*.
- Proust, N., Preston, A.J., & Paquette, L.A. (2009) Workable Synthetic Route to Functionalized 1,6-Benzodiazocines. *Heterocycles*, **77**, 163–166.
- Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crapo, J.D., & Freeman, B.A. (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **266**, 22028–22034.
- Ramos-Morales, F.R., Correa-Basurto, J., Saavedra-Vélez, M., Acosta-Hernández, M.E., Gasca-Pérez, E., Pérez-Palacios, A., & Trujillo-Ferrara, J.G. (2012) Modelo PTZ: un screening primario para el desarrollo de nuevas moléculas con actividad anticonvulsivante. *Arch. neurociencias (México, D.F.)*, **17**, 45–48.
- Rantanen, K., Eriksson, K., & Nieminen, P. (2012) Social competence in children with epilepsy--a review. *Epilepsy Behav.*, **24**, 295–303.
- Rivas-Arancibia, S., Gallegos-Ríos, C., Gomez-Crisostomo, N., Ferreira-Garcidueñas, E., Flores Briseño, D., Navarro, L., & Rodríguez-Martínez, E. (2011) Oxidative Stress and Neurodegenerative Disease. In Chuen-Chung Chang, R. (ed), *Neurodegenerative Diseases: Processes, Prevention, Protection and Monitoring*, 1st edn. Intech, Shanghai, China, pp. 53–88.
- Rubinstein, A.L. (2006) Zebrafish assays for drug toxicity screening. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **2**, 231–240.
- Saavedra-Vélez, M.V., Correa-Basurto, J., Matus, M.H., Gasca-Pérez, E., Bello, M., Cuevas-Hernández, R., García-Rodríguez, R.V., Trujillo-Ferrara, J., & Ramos-Morales, F.R. (2014) Seeking potential anticonvulsant agents that target GABAA receptors using experimental and theoretical procedures. *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, **28**, 1217–1232.
- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., & Voelker, D. (2008) The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **15**, 394–404.
- Scimemi, A., Semyanov, A., Sperk, G., Kullmann, D.M., & Walker, M.C. (2005) Multiple and plastic receptors mediate tonic GABAA receptor currents in the hippocampus. *J. Neurosci.*, **25**, 10016–10024.
- Shu, B., Zheng, Y., Wang, S.-B., Deng, X.-Q., & Quan, Z.-S. (2013) Design, synthesis, and anticonvulsant activity evaluation of 4-(3-alkoxy-phenyl)-2,4-dihydro-[1,2,4]triazol-3-ones. *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **346**, 127–133.

- Smith, M.B. (2011) *Organic Synthesis, Third Edition*. Academic Press; 3 edition.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008) The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **83**, 13–34.
- Stables, J.P. & Kupferberg, H.J. (1997) The NIH anticonvulsant drug development (ADD) program: preclinical anticonvulsant screening project. In Avanzini, G., Tanganelli, P., & M, A. (eds), *Molecular and Cellular Targets for Anti-Epileptic Drugs*. John Libbey and Co, pp. 191–198.
- Stehr, C.M., Linbo, T.L., Incardona, J.P., & Scholz, N.L. (2006) The developmental neurotoxicity of fipronil: notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae. *Toxicol. Sci.*, **92**, 270–278.
- Strupińska, M., Rostafińska-Suchar, G., Stables, J.P., & Paruszewski, R. (2013) New derivatives of benzylamide with anticonvulsant activity. *Acta Pol. Pharm.*, **66**, 155–159.
- Sullivan, F.M. & McElhatton, P.R. (1977) A comparison of the teratogenic activity of the antiepileptic drugs carbamazepine, clonazepam, ethosuximide, phenobarbital, phenytoin, and primidone in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **40**, 365–378.
- Swaab, D.F., Boer, G.J., & Feenstra, M.G. (1988) Concept of functional neuroteratology and the importance of neurochemistry. *Prog. Brain Res.*, **73**, 3–14.
- Ternes, T.A. (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.*, **32**, 3245–3260.
- Thaakur Santhrani, E.M.G.R.S. (2012) Amelioration of carbamazepine induced oxidative stress and hematotoxicity by vitamin C. *Spat. DD - Peer Rev. J. Complement. Med. Drug Discov.*, **2**, 173–180.
- Thurman, D.J., Beghi, E., Begley, C.E., Berg, A.T., Buchhalter, J.R., Ding, D., Hesdorffer, D.C., Hauser, W.A., Kazis, L., Kobau, R., Kroner, B., Labiner, D., Liow, K., Logroscino, G., Medina, M.T., Newton, C.R., Parko, K., Paschal, A., Preux, P.-M., Sander, J.W., Selassie, A., Theodore, W., Tomson, T., & Wiebe, S. (2011) Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. *Epilepsia*, **52 Suppl 7**, 2–26.
- Ton, C., Lin, Y., & Willett, C. (2006) Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.*, **76**, 553–567.

- Vajda, F.J.E. (2002) Valproate and neuroprotection. *J. Clin. Neurosci.*, **9**, 508–514.
- Van den Brandhof, E.-J. & Montforts, M. (2010) Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **73**, 1862–1866.
- Venugopalan, B., Iyer, S.S., & de Souza, N.J. (1985) TiCl₄-Induced Functionalisation of Dibenzo[b,f][1,4]diazocine-6,11-(5H,12H)-diones. *Heterocycles*, **23**, 1425–1430.
- Wang, J., Azzam, J., & Young, L. (2003) Valproate inhibits oxidative damage to lipid and protein in primary cultured rat cerebrocortical cells. *Neuroscience*, **116**, 485–489.
- Westerfield, M. (2007) *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio Rerio)*, 5th edn. University Oregon Press, Eugene, Oregon.
- Wolfe, J.F., Greenwood, T.D., & Mulheron, J.M. (1998) Recent trends in the development of new anti-epileptic drugs. *Expert Opin. Ther. Pat.*, **8**, 361–381.
- Yu, J.T., Bouwer, E.J., & Coelhan, M. (2006) Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agric. Water Manag.*, **86**, 72–80.
- Zodrow, J.M., Stegeman, J.J., & Tanguay, R.L. (2004) Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish. *Aquat. Toxicol.*, **66**, 25–38.