



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

---

---

INSTITUTO DE

Doctorado en Neuroetología

**“Evaluación del posible efecto anticonvulsivante y hepatotóxico por la administración crónica de (S)-2-(1,3-dihidroisoindol-2-il)-3-(1H-indol-3-il)propanoato de metilo y carbamazepina en ratón macho de la cepa CD1.”**

**TESIS**

Presenta:

MC Mario Eduardo Acosta Hernández

Director:

Dr. Fernando Rafael Ramos Morales

Comité tutorial:

Dra. María Elena Hernández Aguilar

Dr. Armando Martínez Chacón

Dr. Juan Francisco Rodríguez Landa

Xalapa, Veracruz

Junio, 2014

|  |    |
|--|----|
| Índice   |    |
| 1 Resumen  | 1  |
| Abstract   | 3  |
| 2 Introducción   | 4  |
| 3 Antecedentes   |    |
| 3.1 Epilepsia  |    |
| 3.1.1 Epidemiología  | 5  |
| 3.1.2 Etiología  | 6  |
| 3.1.3 Clasificación de las crisis convulsivas  | 6  |
| 3.1.3.1 Crisis convulsivas parciales   | 7  |
| 3.1.3.2 Crisis convulsivas generalizadas   | 7  |
| 3.2 Tratamiento farmacológico de las crisis convulsivas  | 10 |
| 3.3 Isoindolinas   | 13 |
| 3.3.1 Aplicaciones biológicas de las isoindolinas  | 13 |
| 3.4 Canales de Ca <sup>2+</sup>  | 17 |
| 3.5 Isoindolinas como agentes anticonvulsivantes   | 19 |
| 3.5.1 Acoplamiento molecular ( <i>Docking</i> )  | 18 |
| 3.6 Biotransformación de fármacos anticonvulsivos  | 20 |
| 3.7 Hepatotoxicidad inducida por fármacos  | 20 |
| 3.8 Pruebas de Funcionamiento Hepático (PFH) y su relación con la hepatotoxicidad por fármacos | 26 |

|   |    |
|---|----|
| 3.9 Hepatotoxicidad inducida por el tratamiento crónico de fármacos anticonvulsivantes y ansiolíticos                                     | 28 |
| 4 Justificación   | 30 |
| 5 Hipótesis   | 30 |
| 6 Objetivo General  | 31 |
| 6.1 Objetivos Particulares  | 31 |
| 7 Materiales y métodos  |    |
| 7.1 Reactivos   | 32 |
| 7.2 Sujetos experimentales  | 32 |
| 7.3 Obtención y manejo de muestras sanguíneas   | 33 |
| 7.4 Determinación de las pruebas de funcionamiento hepático   | 33 |
| 8 Procedimientos experimentales   |    |
| 8.1 Síntesis  | 34 |
| 8.2 Caracterización   | 34 |
| 8.3 Evaluación de la actividad anticonvulsivante mediante el modelo de inducción química por PTZ  | 35 |
| 8.4 Modelos estadísticos  | 37 |
| 9 Resultados  |    |
| 9.1 Síntesis  | 39 |
| 9.2. Caracterización  | 39 |
| 9.3 Evaluación del efecto anticonvulsivante posterior al tratamiento crónico del derivado de isoindolina en comparación con carbamazepina | 41 |

|  |    |
|--|----|
| 9.4 Evaluación del efecto hepatotóxico mediante la valoración de PFH   | 44 |
| 10 Discusión   | 50 |
| 11 Conclusiones  | 53 |
| 12 Propuestas  | 54 |
| 13 Bibliografía  | 55 |
| 14 Apéndices   |    |
| Apéndice I   |    |
| Química computacional  | 77 |
| Apéndice II  |    |
| Estudio teórico computacional y evaluación de la actividad anticonvulsivante del (S)-2-(1,3-dihidroisoindol-2-il)-3-(1 <i>H</i> -indol-3-il)propanoato de metilo | 81 |
| Apéndice III   |    |
| Valores obtenidos de los diferentes análisis de las pruebas de funcionamiento hepático   | 89 |

## 1. Resumen

La epilepsia consiste en un conjunto de trastornos neurológicos crónicos que tienen en común la existencia de episodios repentinos y transitorios (conocidas como crisis) de descargas anormales y sincrónicas de un grupo de células del sistema nervioso central (SNC). El tratamiento farmacológico está orientado a evitar las crisis convulsivas, tratando de no interferir con la función cerebral normal del individuo. Los fármacos empleados en el tratamiento de las crisis convulsivas se denominan anticonvulsivantes, la selección de éstos, se da con base a diferentes criterios, entre los que se encuentran: el diagnóstico del tipo de crisis, el mecanismo de acción del fármaco, eficacia, tolerancia y efectos secundarios. Si bien en la terapéutica existen diversos medicamentos para el control de las crisis convulsivas estos no son siempre eficaces, además, algunos de ellos pueden llegar a producir efectos adversos en administraciones crónicas en los pacientes, por lo que es necesario continuar con el desarrollo y/o descubrimiento de moléculas que mejoren la eficacia anticonvulsivante y generen menores efectos adversos con la finalidad de proponerlas como una posible alternativa para el tratamiento de la epilepsia. En un estudio previo se evidenció que las moléculas heterocíclicas conocidas como isoindolinas-2-substituidas poseen efectos anticonvulsivantes. Mediante la técnica de docking, se determinó la interacción de una serie de isoindolinas con el canal de  $Ca^{2+}$  tipo L. Posterior al estudio computacional, se realizó la síntesis selectiva y seguida de su respectiva caracterización mediante técnicas espectroscópicas. El modelo biológico se llevó a cabo en ratones macho de la cepa CD1, administrándose durante 30 días el derivado de isoindolina (10 mg/Kg) y carbamazepina (20 mg/Kg) y evaluándose el efecto anticonvulsivante los días 0, 15 y 30, respectivamente, utilizando el modelo químico de inducción convulsiones por pentilentetrazol (PTZ, 50 mg/Kg). En estos experimentos, el derivado de isoindolina mostró ser más eficaz que carbamazepina, observándose un mayor efecto protector al aumentar el tiempo de latencia y disminuir tanto el tiempo de duración y recuperación a la crisis convulsiva. En el modelo de hepatotoxicidad, de acuerdo con los resultados de las enzimas determinadas, los sujetos a los cuales se les administró el derivado de

isoindolina no presentan elevaciones significativas de los diferentes analítos. Para el caso de carbamazepina, se observó un aumento en la enzima aspartato amino transferasa, bilirrubinas directa e indirecta, lo cual pudiera ser indicativo de una hepatitis de origen farmacológico.

## **Abstract**

Epilepsy is a group of chronic neurological disorders have in common the occurrence of sudden and transitory episodes of abnormal discharge on a group of neurons in a central nervous system. Pharmacological treatment of epilepsy is focused to preventing seizures, trying not to interfere with normal brain function or produce undesirable effects that affect the quality of life of patients. The treatment of this disease is the chronic administration of anticonvulsant drugs (AEDs), however, approximately 30% of patients with epilepsy have recurrent seizures. Additionally, major concerns of pharmacotherapy of epilepsy include high incidence of severe side effects and pharmacoresistance which are factors that promote to researches looking for compound with anticonvulsant activity that enhance anticonvulsant efficacy and fewer adverse effects. Previously, a computational theoretical study was performed and evaluate two series of isoindolinas as possible L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel (LCC) blockers; the results of this screening support ours hypothesis. Also values of  $\Delta G$  allow selecting that compound that shows more stability and consequently greater affinity, and then we perform their respective synthesis. The biological model was conducted in CD1 male mice, administered for 30 days the isoindoline derivative (10 mg/kg) and carbamazepine (20 mg/Kg) and evaluated the anticonvulsant effect at days 0, 15 and 30, respectively, using the model of chemical seizure induction by pentylenetetrazole (PTZ, 50 mg/Kg). The isoindoline derivative shown has a greater biological efficacy and potency when administered chronically in CD1 male mice, maintaining the same protective effect on the PTZ model throughout treatment. In hepatotoxicity model the isoindoline group not shown significant elevations of the different analytes, however, carbamazepine group, increased aspartate aminotransferase, direct and indirect bilirubin, which could be indicative of drug-induced hepatitis.

## 2. Introducción

La epilepsia es un conjunto de trastornos neurológicos crónicos que afectan del 0.5 al 2% de la población mundial, esta patología consiste en la existencia de episodios repentinos y transitorios de descargas anormales y sincrónicas de un grupo de neuronas del SNC. En el tratamiento de esta enfermedad se utilizan fármacos llamados anticonvulsivantes (**Uldall, 2006; Conn, 2003**).

Las isoindolinas son compuestos heterocíclicos formados por un anillo aromático unido a un ciclo de 5 miembros con un átomo de nitrógeno en la posición 2 del anillo. Son importantes intermediarios en la síntesis de nuevos medicamentos con diversas actividades biológicas como antihipertensivos, diuréticos, antiinflamatorios, por mencionar algunos ejemplos (**Sanna, 1985; Cignarella, 1981**). En un trabajo previo, fueron evaluadas una serie de isoindolinas, las cuales, mediante el método computacional de acoplamiento molecular evidenciaron la naturaleza de las interacciones de los mismos con la estructura cristalizada del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (**Mancilla, 2010**). En este trabajo, se evaluó la eficacia anticonvulsivante del (S)-2-(1,3-dihidroisoindol-2-il)-3-(1*H*-indol-3-il)propanoato de metilo y carbamazepina en el modelo agudo de inducción de convulsiones por PTZ, además de determinar los posibles efectos adversos a nivel hepático de la administración crónica de estos compuestos. Los resultados muestran que el derivado de isoindolina posee un mayor efecto protector que carbamazepina, reduciendo los tiempos de latencia, duración y recuperación a la crisis convulsiva, no encontrándose diferencias en los distintos tiempos de administración (0, 15 y 30 días). De la misma manera en el modelo de toxicidad los resultados mostraron que los sujetos experimentales del grupo carbamazepina en el día 30 de tratamiento presentaron niveles elevados en las enzimas aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina, bilirrubina directa e indirecta, lo cual sugiere, una posible hepatitis de origen farmacológico comparado con el grupo vehículo e isoindolina.



### 3. Antecedentes

#### 3.1 Epilepsia

##### 3.1.1 Epidemiología

La epilepsia consiste en un conjunto de trastornos neurológicos crónicos que tiene en común la existencia de episodios repentinos y transitorios de descargas anormales y sincrónicas de un grupo de neuronas del SNC, frecuentemente acompañadas por desórdenes del estado de ánimo y deficiencias cognitivas **(Xu, 2013; CDC, 2011; Gaby, 2007; Uldall, 2006)**.

Estudios epidemiológicos indican que es uno de los trastornos neurológicos más importantes, afectando alrededor del 1% de la población mundial, es decir, que entre 4 y 10 personas por cada 1000 habitantes padecen esta patología **(de Biase, 2014; Xu, 2013; CDC, 2011; Suarez, 2007)**. Existen alrededor de 60 millones de casos en el mundo **(Buenafe, 2013)**, de los cuales, se calcula que aproximadamente el 85% de éstas viven en países en vías de desarrollo **(Leppik, 2013; CDC, 2011; Bell, 2001)**. La incidencia anual de epilepsia en estos países es de 68.7 por cada 100,000 habitantes mientras que en países industrializados es de 47.4 por cada 100,000 **(Leppik, 2013)**.

Se estima que la epilepsia afecta alrededor de 2.5 millones de personas en Estados Unidos, diagnosticándose 200,000 nuevos casos de epilepsia cada año **(CDC, 2011)**. En México, se considera que existe un aproximado de 900,000 personas con epilepsia, de las cuales, tres cuartas partes son menores de 20 años **(Rubio, 2007; Rubio, 2000)**.

En un individuo sano, la actividad neuronal se mantiene en un estado de equilibrio dinámico regulado por procesos neuronales inhibitorios y excitatorios, una variación en estos mecanismos puede generar la epilepsia **(Olsen, 1997; Mody, 1993)**.

### 3.1.2 Etiología

Esta patología puede deberse a diferentes causas entre las que se encuentran factores genéticos, estructurales, metabólicos y en otras se desconoce la causa **(Xu, 2013)**. La epilepsia se divide en dos tipos, las primarias o idiopáticas que son de origen desconocido y las secundarias o sintomáticas. Estas últimas, se consideran secundarias a un proceso patológico del SNC de causa conocida como hipoxia, infecciones, traumatismos, malformaciones congénitas, alteraciones innatas del metabolismo, neoplasias e intoxicaciones **(CDC, 2011; Gómez-Alonso, 2011; ILAE, 2010, 1989)**. La epilepsia idiopática, se define como un padecimiento asociado a una aparente predisposición genética, siendo la crisis convulsiva la única manifestación de la enfermedad **(Gómez-Alonso, 2011; ILAE, 2010; 1989)**.

### 3.1.3 Clasificación de las crisis convulsivas

Esta clasificación facilita la selección del fármaco anticonvulsivante, la cual depende exclusivamente del tipo de crisis **(Rubio, 1997)**. De acuerdo a la Liga Internacional contra la Epilepsia (por sus siglas en inglés ILAE) las crisis se dividen de la siguiente manera **(Gómez-Alonso, 2011; ILAE, 2010, 1989;)**:

Generalmente, la epilepsia requiere de un tiempo de latencia para manifestarse, en un inicio el cerebro funciona de manera normal hasta una etapa de desarrollo del individuo o bien después de algún tipo de daño **(Sarvic, 2014; Dichter, 1997)**. De esta manera podemos llamar epileptogénesis al proceso dinámico por el cual el cerebro se convierte en epiléptico y comienza a generar crisis espontáneas y recurrentes **(Lóscher, 2002; Dichter, 1997; Engel, 1989)**.

### **3.1.3.1 Crisis convulsivas parciales**

Estas se caracterizan porque la actividad electrónica anormal queda restringida en cierta área formando lo que se conoce como foco epiléptico, pudiendo restringirse a un hemisferio cerebral. Por otra parte, las crisis parciales se clasifican en simples, aquellas en las que la conciencia no se ve alterada, mientras que en las parciales complejas existen una pérdida de la misma (**Gómez-Alonso, 2011; ILAE, 2010, 1989**).

### **3.1.3.2. Crisis convulsivas generalizadas**

En este tipo de crisis involucra a ambos hemisferios cerebrales. La crisis inicia en un área del cerebro y se propaga al resto del mismo. Existe alteración de la conciencia, la cual puede ser la manifestación inicial, las crisis generalizadas, pueden subdividirse en crisis convulsivas (crisis tónicas, clónicas y tónico-clónicas) y crisis no convulsivas (crisis de ausencia, mioclónicas y atónicas) (**Gómez-Alonso, 2011; ILAE, 2010, 1989**).

En condiciones normales el potencial de acción se inicia con la apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  seguido de despolarización y apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , el calcio se acopla a las proteínas fijadoras de calcio en el citoplasma y es transportado a la mitocondria para evitar una concentración excesiva que pudiera llegar a ser citotóxica, por último se abren los canales de  $\text{K}^+$ , que repolarizan a la célula para que pueda haber una nueva despolarización (**Valsecchia, 1999**).

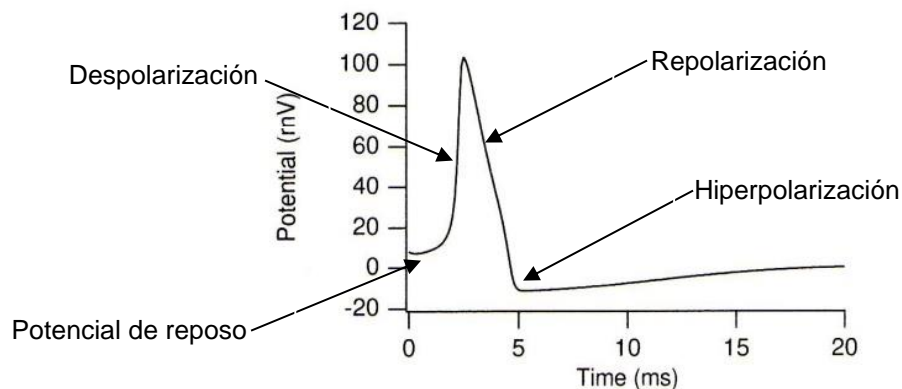


Figura 1. Representación de las fases de un potencial de acción (**Valsecía, 1999**).

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  $\text{Na}^+$  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  $\text{GABA}_A$  y mecanismo lento mediado por la activación de canales de potasio dependientes de voltaje y asociados a receptores  $\text{GABA}_B$ , 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 (**Delgado-Escueta, 1999; Ayala, 1973**).

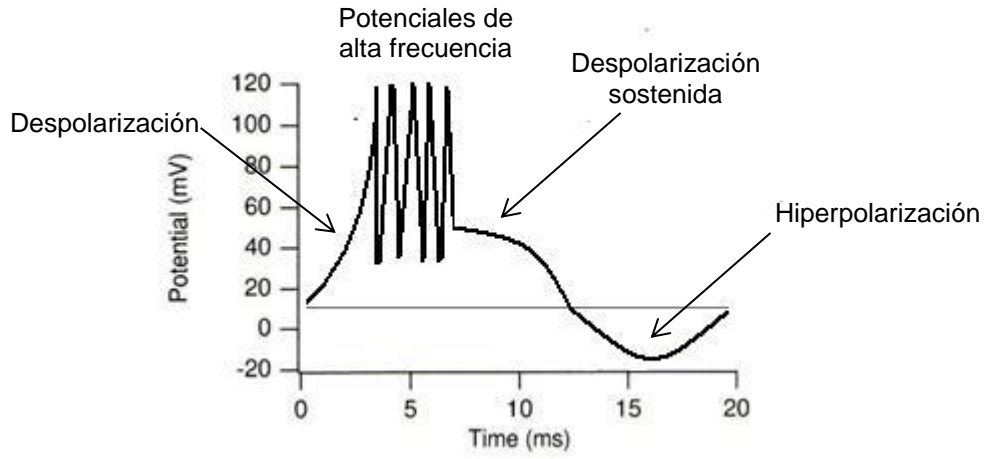


Figura 2. Esquema representativo de las fases de un PDS (Valsecchia, 1999).

### 3.2 Tratamiento farmacológico de las crisis convulsivas

La terapia farmacológica representa la primera línea de tratamiento de la epilepsia y es efectiva en la mayoría de los pacientes (**Gaby 2007; Glauser, 2006; Shorvon, 1996**). A pesar de la aparición de nuevos fármacos anticonvulsivos, aproximadamente el 30% de los pacientes con epilepsia experimentan crisis convulsivas recurrentes y muchos experimentan efectos secundarios indeseables. Por lo que, existe la necesidad de desarrollar nuevas fármacos que sean más eficaces y seguros, los cuales, además, reduzcan la frecuencia y la gravedad de las crisis (**de Biase, 2014; Chung, 2010**).

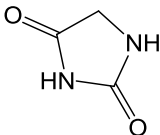
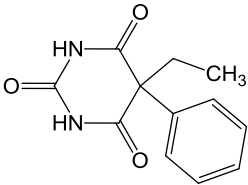
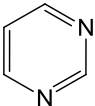
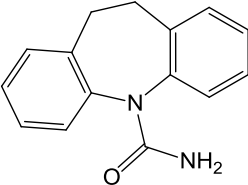
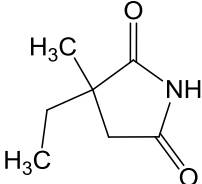
El tratamiento farmacológico de la epilepsia está orientado a evitar las crisis convulsivas, tratando de no interferir con la función cerebral normal o producir efectos indeseables que afecten la calidad de vida del paciente (**Ben-Menachem, 2014; Piana, 2014; Leppik, 2013**). Estos fármacos se denominan anticonvulsivantes, los cuales se seleccionan con base a diferentes criterios: el diagnóstico de tipo de crisis, el mecanismo de acción del fármaco, la eficacia, tolerancia y los efectos adversos (**Ramos-Morales, 2012; Glauser, 2006**).

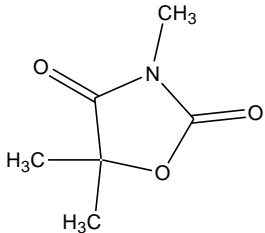
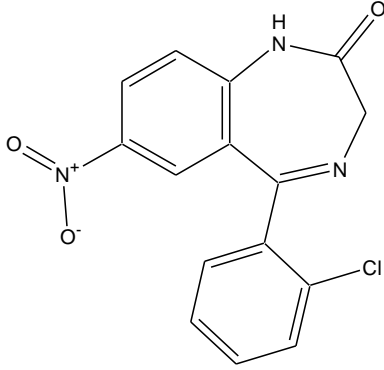
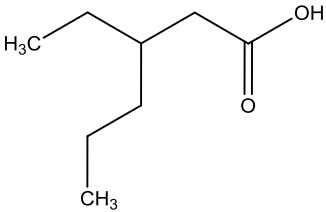
Los principales mecanismos de acción de los fármacos anticonvulsivantes son los siguientes (**Cascino, 2011; Bamagous, 2010; Rodriguez, 2010; Stafstrom, 2010**):

- Favorecer mecanismos inhibitorios: agentes GABAérgicos, inhibición de la GABA transaminasa, disminución de la recaptura de GABA en la sinapsis, aumento de la síntesis de GABA.
- Disminución de los mecanismos excitatorios: bloqueo de los receptores NMDA y AMPA o disminución de la liberación de neurotransmisores excitatorios.
- Estabilización de la membrana neuronal: bloque de canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los anticonvulsivantes según su mecanismo de acción pueden clasificarse en fármacos específicos y no específicos. Los primeros actúan modificando la conducción de iones a nivel de la membrana excitable. Los no específicos tienen efecto depresor del SNC al relacionarse con la acción de GABA (**Bamagous, 2010; Rodriguez, 2010**).

Tabla 1 muestra la estructura y mecanismo de acción de algunos fármacos anticonvulsivantes de primera generación (**Cascino, 2011; Rodriguez, 2010; Stafstrom, 2010; Conn, 2003**).

| Fármaco                         | Estructura  | Mecanismo de acción  |
|---------------------------------|---|--|
| Hidantoínas                     |    | Eficaz contra todos los tipos de convulsiones parciales y tónico-clónicas excepto para las crisis de ausencia. El mecanismo de acción no es del todo claro, existe evidencia de que ejerce efecto a nivel de canales iónicos y estabilización de la membrana celular.  |
| Barbitúricos (fenobarbital)     |  | Posee una toxicidad relativamente baja, es barato y se conserva como uno de los fármacos más eficaces y de mayor uso. El mecanismo de acción de este fármaco incluye posiblemente, la inhibición sináptica por una acción en el receptor GABA <sub>A</sub> , incrementando la conducción intracelular postsináptica de Cl <sup>-</sup> , reduciendo la excitabilidad neuronal. |
| Desoxibarbitúricos (primidona)  |  | Si bien el mecanismo de acción no es del todo claro, se cree que es similar a fenobarbital.  |
| Iminoestilbenos (carbamazepina) |  | Se emplea para el tratamiento de las crisis tónico-clónicas y en las crisis parciales simples o complejas. Este medicamento ejerce un efecto estabilizador sobre las membranas excitables reduciendo el flujo de iones Na <sup>+</sup> , esto se debe a que inhibe los canales Na <sup>+</sup> de dependientes de voltaje.   |
| Succinimidias (etosuccimida)    |  | Eficaz contra las crisis conocidas como pequeño mal. El mecanismo de acción de las succinimidias probablemente implica a los canales de Ca <sup>2+</sup> , inhibiendo la Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> /ATPasa, inhibiendo la GABAaminotransferasa, teniendo un efecto importante sobre los canales de Ca <sup>2+</sup> reduciendo la  |

|                                   |  |  |
|-----------------------------------|--|--|
|                                   |  | actividad de los canales tipo T.   |
| Oxazolidindionas<br>(trimetadona) |   | Este medicamento ejerce su mecanismo de acción regulando la entrada de Ca <sup>2+</sup> al canal tipo T.   |
| Benzodiazepinas<br>(clonazepam)   |   | El clonazepam es un fármaco de acción prolongada con eficacia sobre las crisis de ausencia y en algunos casos en las crisis mioclónicas. Su mecanismo de acción se lleva a cabo aumentando la conductancia de Cl <sup>-</sup> inducido por GABA, reduce la excitabilidad neuronal aumentando la conductancia de K <sup>+</sup> dependiente de Ca <sup>2+</sup> . |
| Ácido valproico                   |  | Varios estudios indican que los niveles del GABA se ven aumentados a nivel de SNC posterior a la administración del medicamento, aunque el mecanismo de este fenómeno no se conoce aún. Este fármaco inhibe la GABA transaminasa y la recaptación de GABA a nivel neuronal en las neuronas.  |

A pesar de que existen en el mercado una gran variedad de medicamentos, no existe un fármaco ideal para el tratamiento de la epilepsia, por lo cual, es necesario el desarrollo de nuevos compuestos los cuales propongan una nueva alternativa para la terapia de esta enfermedad, disminuyendo los diferentes efectos adversos que generan los fármacos actualmente en uso. Por ejemplo, se sabe que etosuccimida causa cansancio, insomnio, dolor de cabeza y conducta psicótica (Posner, 2005; Wallace, 1996), por otro lado, carbamazepina, oxocarbamazepina, fenobarbital, ácido valproico y fenitoína pueden generar elevación de las enzimas hepáticas (Fredriksson, 2014; Maheswari, 2014; Chakrakodi, 2013; Planjar-Prvan, 2013).



### 3.3 Isoindolinas

Las isoindolinas, son importantes intermediarios para la síntesis de nuevos medicamentos los cuales presentar diversas actividades biológicas (**Mancilla, 2010; Sanna, 1985; Cignarella, 1981**). Las isoindolinas-2-substituidas derivadas de aminoácidos pueden ser sintetizadas por los siguientes métodos (**Trejo-Muñoz 2014, 2013; Mancilla-Percino, 2001**):

- a) Alquilación de isoindolinas
- b) Alquilación y reducción de talamidas
- c) Ciclocondensación de  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -dibromo-*o*-xileno con aminas primarias
- d) Ciclocondensación de  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -dibromo-*o*-xileno con  $\alpha$ -aminoácidos

#### 3.3.1 Aplicaciones biológicas de las isoindolinas

Dentro de las aplicaciones biológicas de estos compuestos destacan su actividad antiviral (**Hashimoto, 2002; Berger, 1999**), de igual manera han mostrado actividad antiinflamatoria y diurética (**Kumar, 2013; Matalka, 2012; Qinna, 2012; Shakir, 2012; Mancilla, 2010**). Por lo que han sido empleados en el tratamiento de enfermedades coronarias y han sido evaluados como neurobloqueadores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos (**Zhao, 2014; Mancilla-Percino, 2010 Sanna, 1985**), de igual manera, poseen efecto sedante (**Hashimoto, 2002**), han mostrado efectos hipoglucemiantes (**Tso, 2014; Sou, 2002, Takahashi, 2000**), hipolipemiantes (**Chapman, 1984; Chapman, 1983; Hall, 1983; Chapman, 1979;**), antitumoral (**Aliabadi, 2014; Zhang, 2013; Shultz, 2011; Al-Soud, 2001**), así mismo, han mostrado actividad antioxidante (**Kálai, 2011**). Recientemente derivados de la isoindolina-1,3-diona ha sido evaluada como inhibidor de acetilcolinesterasa a nivel de SNC (**Mohammadi-Farani, 2013**), **Anantham en 2014** reportó que derivados de isoindolinas pueden ser agonistas parciales o antagonistas de los receptores D2/D3 dopaminérgicos, por otra parte, el Danoprevir (ITMN-191/R7227) ha mostrado ser un inhibidor de la proteasa NS3/4A del virus de la Hepatitis C (**Jiang, 2014**). Dentro del amplio espectro de acción de los derivados de isoindolina, han mostrado poseer efecto antituberculoso

(Stavrakov, 2013), así mismo, se han mostrado efecto como antimicóticos (Amin, 2013).

El indoprofeno (Figura 3) es una isoindolina derivada del ácido fenilpropanoico, la cual, ha demostrado inhibir el dolor tanto agudo como subcrónico, su efecto está relacionado directamente con la inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas (Buttioni, 1981).

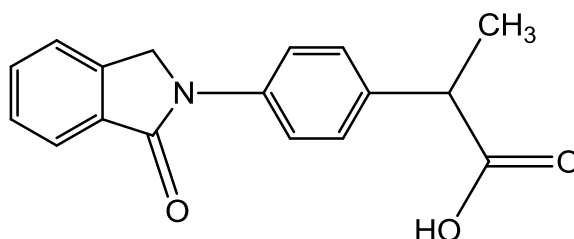


Figura 3. Estructura química del Indoprofeno.

Los derivados de isoindolinas inhiben de manera selectiva la prolidipeptidasa (DPP8), molécula homóloga de la DPP4, que es blanco de acción de los fármacos para el tratamiento de la diabetes tipo II (Van Goethem, 2008; Weir-Torn, 2005).

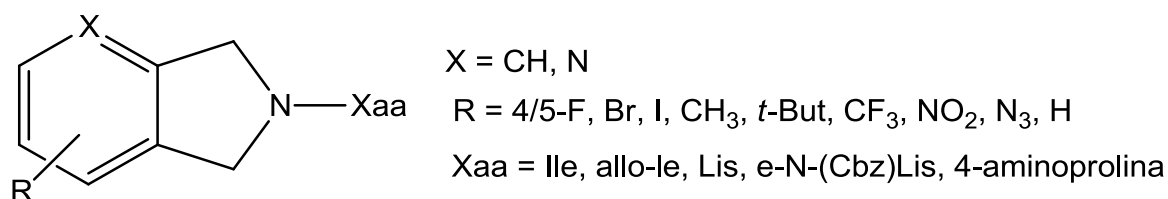


Figura 4. Estructura general de los inhibidores de la enzima DPP8.

Otros derivados de isoindolinas son bloqueadores  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - adrenérgicos, los cuales han demostrado ser una alternativa en el tratamiento de la hipertensión (Dharam, 2005).

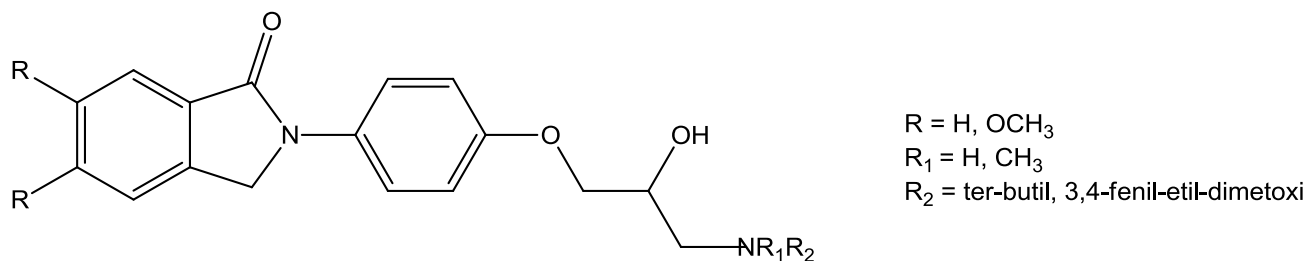


Figura 5. Estructura química de la 1-oxo-isoindolina.

Las imidazolininas ejercen efectos neuroprotectores, estos compuestos tienen afinidad por los receptores de imidazolina, los cuales están ampliamente distribuidos en el cerebro. Este efecto se debe a que las imidazolininas protegen a los lisosomas de la citotoxicidad por estrés oxidativo previniendo la muerte de los astrocitos, lo que es esencial para evitar lesiones neuronales en condiciones patológicas, como en el caso del Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Mohammadi-Farani, 2013; Choi, 2002). Algunos investigadores han llegado a la conclusión de que el efecto de las imidazolininas puede ser a través de la liberación de noradrenalina, vía  $\alpha_2$ -adrenoreceptores (Schlicker, 1997).

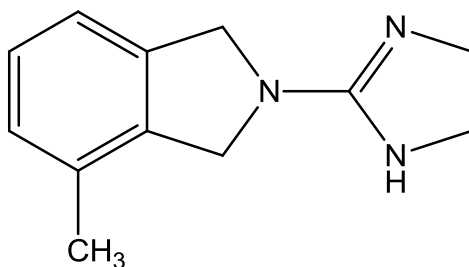


Figura 6. Estructura química del

La isoindolina-1,3-diona, tiene actividad farmacológica como sedante, actualmente un derivado de este compuesto ha mostrado actividad como anticonvulsivante (**Alibiadi, 2014; Abdel-Hafez, 2004**).

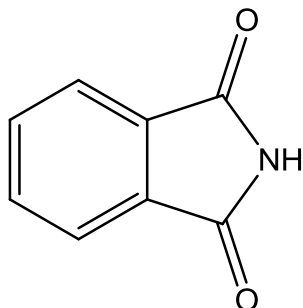


Figura 7. Estructura general de la isoindolina-1,3-diona.

De igual manera, se han realizado el diseño de moléculas y mediante la técnica de modelado molecular se han sintetizado y evaluado la posible actividad citotóxica de derivados de imidas *N*-sustituidas (**Alaa, 2007**).

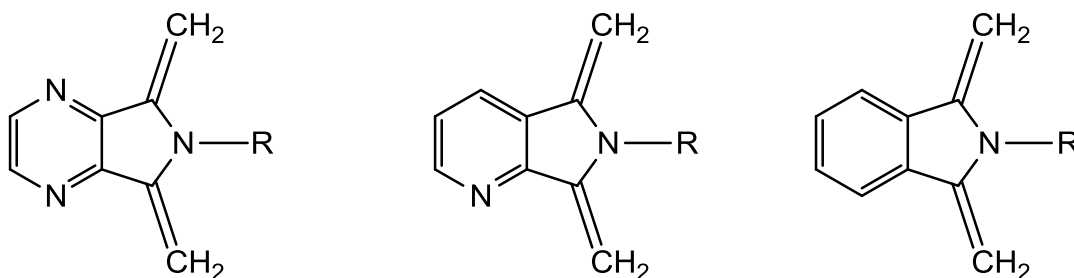


Figura 8. Estructura general de las imidas *N*-sustituidas.

### 3.4 Canales de Ca<sup>2+</sup>

El calcio juega un papel importante en muchos procesos celulares tales como: contracción muscular, regulación de la expresión de genes, liberación de neurotransmisores y la modulación de la excitabilidad de las membranas neuronales (Choi, 2011; Fallon, 2009; Field, 2006; Van Petegem, 2006). El Ca<sup>2+</sup> es considerado como un segundo mensajero, el cual inicia una serie de eventos intracelulares tales como contracción, secreción y transmisión sináptica (Bhat, 2012; Catteral, 2000).

Se han descrito diversos subtipos de canales de Ca<sup>2+</sup> (Flynn, 2000; Tabla 2), y han sido clasificados de acuerdo a estudios electrofisiológicos en L-, N-, P-, Q-, R- y T-, cada uno de los cuales, presenta propiedades farmacológicas y electrofisiológicas diferentes (Catteral, 2000). De manera general, son activados por una despolarización de la membrana celular, en respuesta a potenciales de acción, causando un cambio conformacional en el canal que permite la entrada de Ca<sup>2+</sup> a la célula (Fallon, 2009; Van Petegem, 2006; Finn, 2000).

Tabla 2. Subtipos de canales de calcio sensibles a voltaje (Finn, 2000).

| Tipo | Voltaje | Distribución  | Función   |
|------|---------|---|---|
| L    | Alto    | Predomina en miocardio y músculo liso                                   | Contracción muscular  |
| N    | Alto    | Terminaciones presinápticas   | Liberación de catecolaminas   |
| P    | Alto    | Terminaciones presinápticas, principalmente en las neuronas de Purkinje | Liberación de neurotransmisores   |
| Q    | Alto    | Terminaciones presinápticas   | Liberación de neurotransmisores   |
| R    | Alto    | Tejido neural   | Liberación de neurotransmisores   |
| T    | Bajo    | Tejido ganglionar y terminaciones nerviosas postsinápticas              | Contribuye a la fase 4 de la corriente marcapasos en las células del nodo sinodal |

De manera general el canal de Ca<sup>2+</sup> está formado por subunidades  $\alpha_1$ , (subunidad conductora de iones), así como, varias unidades accesorias  $\alpha_{2-\delta}$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$

(Figura 9) (Field, 2006; Lipkind, 2002; Finn, 2000; Opie, 1997). La subunidad  $\alpha_1$  es la más importante del ya que forma el poro a través del cual pasan los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , y es el sitio de unión de todos los bloqueadores de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por su parte, las subunidades  $\alpha_{2-\delta}$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  actúan principalmente modulando la función de la subunidad  $\alpha_1$  (Finn, 2000).

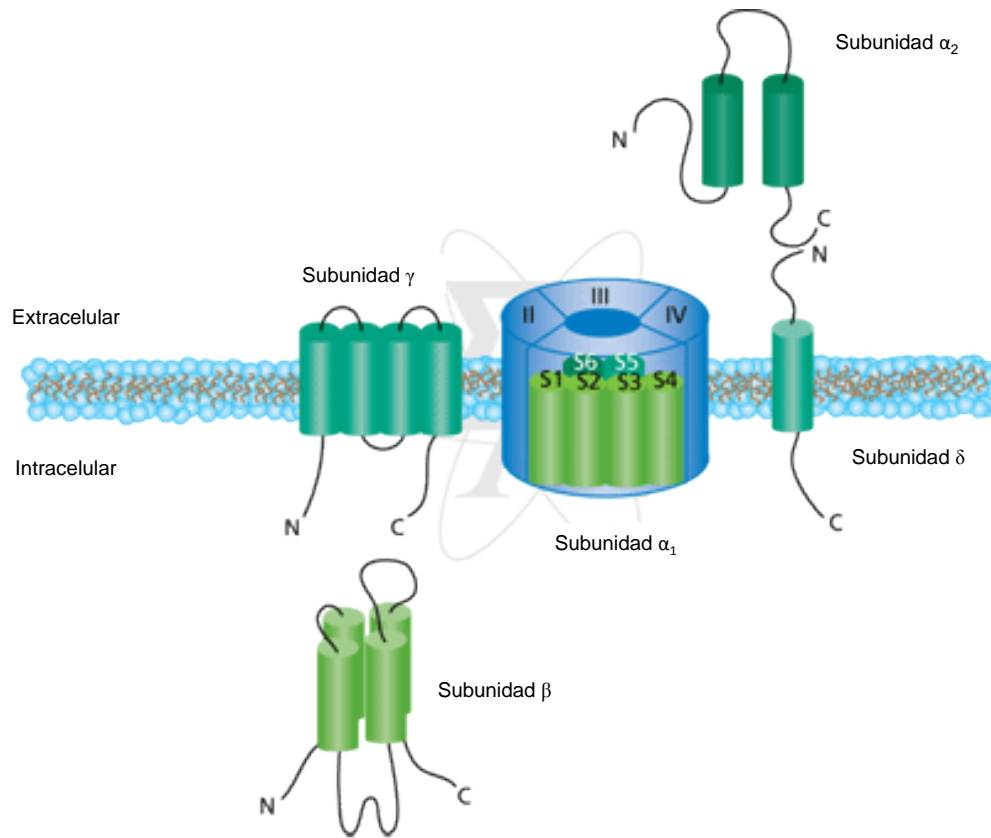


Figura 9. Estructura del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Petegem, 2006; Finn, 2000).

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  poseen una semejanza estructural con los canales de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , los cuales están formados por 4 segmentos homólogos o dominios, además denominados S1 a S6, dispuestos de manera simétrica alrededor del poro central. La estructura del canal activado es casi idéntica a la que presenta el canal de  $\text{K}^+$  (Bhat, 2012; Lipkind 2002, Catterall, 2000).

En un trabajo previo se realizó un estudio un estudio teórico computacional de dos series de isoindolinas 1(a-g) y 2(a-g) como posibles bloqueadores del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Ver apéndice I). Los resultados muestran que ambas series independientemente de su grupo funcional (éster o carboxilo), interaccionan con el poro interno de la proteína. Dichos resultados pudieran sugerir la selectividad de estos compuestos sobre el canal iónico, además, de que en un modelo animal estos derivados podrían mostrar actividad biológica sobre la proteína y por consiguiente a nivel de SNC (**Trejo, 2014; Mancilla, 2010; Acosta-Hernández, 2009**).

### **3.5 Isoindolinas como agentes anticonvulsivantes**

Seguido del estudio computacional, se llevó a cabo la síntesis del derivado de isoindolina que mostró mayor afinidad a nivel teórico para su posterior evaluación del posible efecto anticonvulsivante en ratas macho de la cepa Wistar mediante el modelo de inducción de convulsiones por pentilentetrazol (PTZ) y comparar su efecto biológico contra carbamazepina y etosuccimida (Ver apéndice II). Experimentalmente el (S)-2-(1,3-dihidroisoindol-2-il)-3-(1*H*-indol-3-il)propanoato de metilo mostro una mayor eficacia biológica que los controles farmacológicos al prevenir las crisis convulsivas, así mismo, aumento el tiempo de latencia a la convulsión y por consiguiente reduciendo los tiempos de duración y recuperación a la crisis convulsiva.

### **3.6 Biotransformación de fármacos anticonvulsivos**

La mayoría de los fármacos anticonvulsivos son metabolizados por vía hepática, esto depende del flujo sanguíneo hepático, la concentración de la albumina, integridad de los hepatocitos y del sistema hepatobiliar; si existiera alguna alteración de estos factores ocasionarían cambios en la biotransformación, y la acumulación de metabolitos. Las alteraciones de las funciones hepáticas se ven reflejadas en la elevación de transaminasas, hepatitis aguda, hepatitis granulomatosa, colestasis, ictericia hepatocelular, hepatitis, y en ocasiones, una falla hepática **(Jelena, 2014; Grau, 2013; Abdel Salam, 2013)**.

Algunas enzimas del CYP450, por ejemplo, la 3A4 son específicas de hígado e intestinos y contribuyen de manera importante en el metabolismo de más de la mitad de los fármacos que actúan a nivel de SNC utilizados clínicamente, se cree que esta enzima puede inducir hepatotoxicidad; en un estudio reciente se analizaron 13 fármacos entre ellos carbamazepina, demostrando que este fármaco aumentaba la actividad del CYP3A4 induciendo hepatotoxicidad **(Jelena, 2014; Abdel Salam, 2013; Penner, 2012)**.

### **3.7 Hepatotoxicidad inducida por fármacos**

Durante el tratamiento farmacológico, es ineludible la relación entre la eficacia de la terapia y los efectos no deseados, por lo que, la hepatotoxicidad se refiere generalmente a los daños a nivel de hígado asociados con insuficiencia hepática causada por la exposición a un fármaco **(Fontana, 2014; Jelena, 2014; Eise, 2014; Hussaini, 2014)**. El hígado es un órgano de gran importancia ya que juega un papel esencial en el mantenimiento del equilibrio metabólico, entre sus funciones se incluyen el metabolismo y la eliminación de los componentes químicos a los que el organismo está expuesto directa o indirectamente; el metabolismo de los lípidos, carbohidratos, proteínas, así como, la degradación de fármacos, hormonas y otras sustancias endógenas **(Jelena, 2014; Penner, 2012; Bafna, 2004)**. Su función puede ser evaluada fácilmente mediante la



determinación sérica de analítos, tales como: aspartato aminotransferasa, alanino aminotransferasa, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, directa e indirecta,  $\gamma$ -glutamyl transferasa, lactato deshidrogenasa (**Hoekstra, 2013; Frazer, 2007; Howanitz, 1991**). Los niveles del número de enzimas hepáticas se utilizan como indicadores de diagnóstico de daño hepático, las pruebas de aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa y bilirrubina sérica son las más sensibles para el diagnóstico de enfermedades hepáticas (**Hoekstra, 2013; Frazer, 2007; Harper, 1961**), por ello, los niveles elevados de estas enzimas séricas son indicativos de pérdida celular y pérdida de la integridad funcional de la membrana celular hepática (**Jelena, 2014; Abdel Salam, 2013; Drotman, 1978**).

Muchos de los mecanismos de hepatotoxicidad por medicamentos se deben a la formación de metabolitos reactivos. Entre los fármacos más comunes asociados a la hepatotoxicidad se encuentra el paracetamol, medicamentos anticonvulsivos y antituberculosos. Los medicamentos con frecuencia están asociados a aumentos benignos de las enzimas hepáticas, sin embargo, el daño hepático grave esta reportado en algunos casos, la hepatotoxicidad por fármacos se puede presentar como inflamación, colestasis y la gravedad puede ir desde enzimas aminotransferasas ligeramente elevadas a insuficiencia hepática fulminante. Pacientes con patrones elevados de colestasis presenta elevación de fosfatasa alcalina. De forma aguda la hepatotoxicidad se presenta con dolor abdominal y fiebre como una obstrucción biliar crónica con ictericia o prurito (**Jelena, 2014; Abdel Salam, 2013; Sedky, 2012**).

La biotransformación de carbamazepina (Figura 10) fue primeramente explicada por Faigle y Feldman en 1975. La principal vía metabólica es la oxidación de carbamazepina en su doble enlace en la posición 10,11 en el anillo de azequina y la formación de su correspondiente epóxido. Sin embargo, el epóxido forma especies altamente reactivas y es lentamente transformado, por lo que, en tratamientos crónicos con carbamazepina suele bioacumularse. Clínicamente esto es relevante, ya que, este metabolito posee actividad anticonvulsivante y contribuye de manera importante con su efecto antiepiléptico. Sin embargo, se ha

reportado que el 10,11-epóxido de carbamazepina es responsable del desarrollo de hepatotoxicidad en tratamientos crónicos (Shi, 2014; Puranik, 2013; Ding, 2012; Levy, 2002). El 10,11-epóxido de carbamazepina puede ser metabolizado por la epóxido hidrolasa y formar un diol, el cual puede ser excretado sin metabolizarse o formar un monoglucurónido. La reacción de hidroxilación del anillo aromático de 6 carbonos puede ser en varias posiciones y tal vez formar oxídos de areno llevadas a cabo por las enzimas del CYP450. Estos productos hidroxilados pueden continuar a la fase II de la biotransformación, principalmente glucuronaciones, y así ser excretados (Penner, 2012; Levy, 2002).

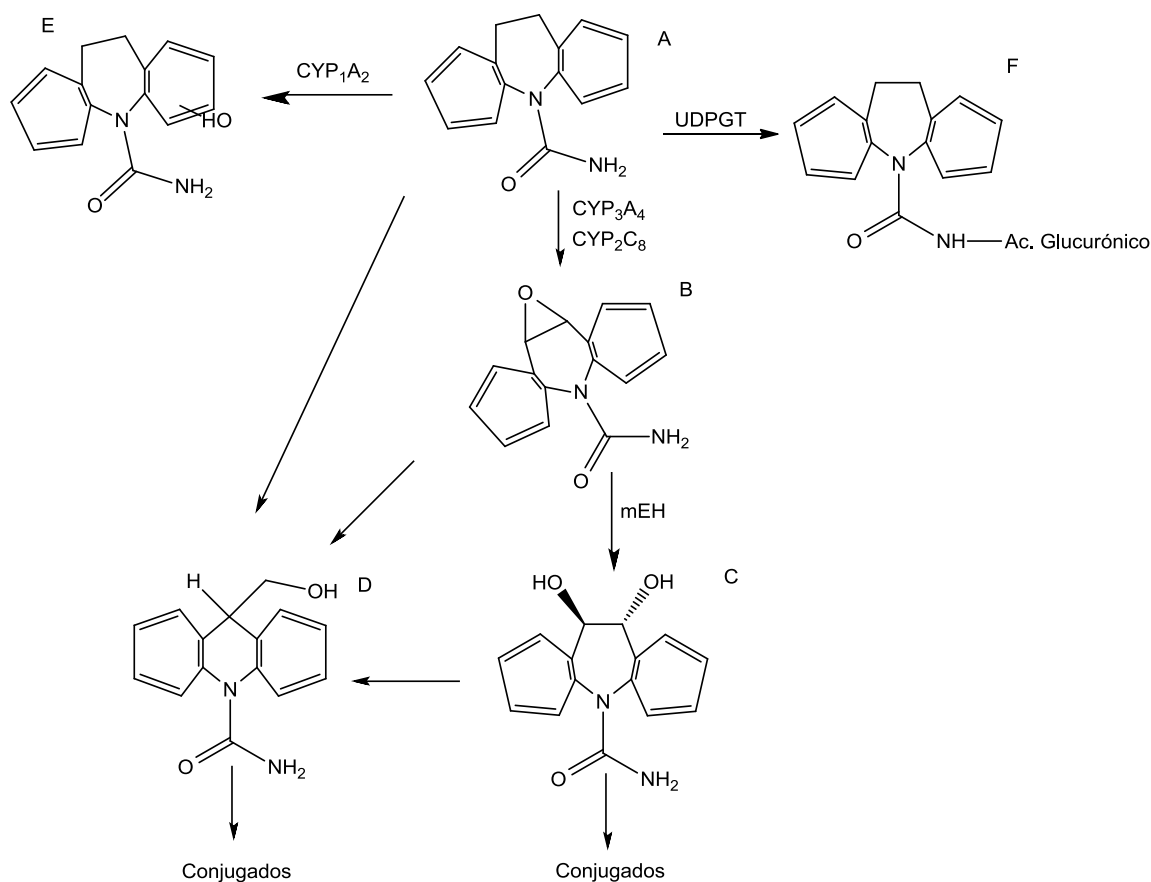


Figura 10. Biotransformación de carbamazepina y las enzimas que catalizan las principales reacciones metabólicas. A, carbamazepina; B, 10,11-epóxido de carbamazepina; C, trans-dihidroxi-10,11-dihidrocarbamazepina; D, aciertan-9-hidroxi-metil-10-carbamazepina; E, 1,2,3- y 4-dihidrocarbamazepina; F, N-glucuronido

de carbamazepina. CYP citocromo P450, mEH, epóxido hidrolasa microsomal; UDPGT, uridina difosfato glucoroniltransferasa (**Levy, 2002**).

Los fármacos anticonvulsivos clásicos, poseen en su estructura anillos aromáticos, por ejemplo fenitoina, fenobarbital y carbamazepina, estos específicamente causan hepatotoxicidad que puede ser por diferencias genéticas o adquiridas en el metabolismo del fármaco o por secreción canalicular, defectos mitocondriales o muerte celular, estos fármacos, son metabolizados por las enzimas del CYP450 y generan la acumulación de metabolitos reactivos, mecanismo que es sabido genera daño hepático. Estos metabolitos generan disfunción mitocondrial y activación del Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ), los cuales son responsables de iniciar señales activadoras de muerte celular de los hepatocitos, por tanto, estas células mueren por apoptosis, necrosis y autofagia. Estudios recientes han comprobado que la lesión hepática por carbamazepina está asociada con acumulación de metabolitos óxidos que generan una disfunción mitocondrial (**Niu; 2014, Abdel Salam; 2013; Penner, 2012; Gonzales, 2010**).

Como se menciona anteriormente, la mayoría de los fármacos se biotrasforman o detoxifican en hígado, por lo regular el metabolismo de las drogas resulta en productos inactivos, la detoxificación usando el sistema del citocromo P450 puede dar lugar a metabolitos activos y potencialmente tóxicos. Las sustancias que son metabolizadas por el hígado son lipofílicas, pero el metabolismo enzimático, convierte las drogas en metabolitos solubles, los cuales son fácilmente excretados por el riñón (**Niu; 2014; Abdel Salam; 2013; Penner, 2012; Gonzeles, 2010**).

El metabolismo general de los fármacos se lleva a cabo por medio de dos fases:

Fase I: involucra al sistema del CYP450, e incluyen reacciones químicas como oxidación, hidrólisis o la reducción de grupos funcionales presentes en los fármacos, esta fase se lleva a cabo en el retículo endoplásmico.

Fase II: intervienen reacciones de conjugación con el ácido glucorónico principalmente, sulfonación, acetilación, conjugación con el glutatión o metilación, esta etapa del metabolismo se lleva a cabo en el citoplasma de los hepatocitos **(Penner, 2012; Gates, 2010; Gonzales, 2010; Xu, 2005)**.

Existen alrededor de 27 familias de genes responsables de las enzimas del citocromo P450, la subfamilia del CYP3A4 es la responsable del metabolismo de una variedad de medicamentos, entre ellos, la carbamazepina, ciclosporina, dapsona, imipramina, dexametasona, ácido valpróico, verapamilo y vincristina. Se han identificado tres mecanismos principales por los cuales se genera toxicidad como resultado de las enzimas del citocromo P450 **(Gates, 2010; Gonzales, 2010; Chilo, 1999)**.

El primer mecanismo o fase I, produce la acumulación de cantidades excesivas del fármaco no metabolizado, la cual es causada por una disminución de la actividad de las enzimas del CYP. Para que la toxicidad se manifieste se necesita que el fármaco posea potencial tóxico, la actividad del CYP450 debe ser más baja de lo normal y que no sea metabolizada por otro grupo de enzimas **(Niu, 2014; Gonzales, 2010; Gates, 2010; Chilo, 1999)**.

Otra vía, es aquella en la que metabolitos electrofílicos formados durante la biotransformación del fármaco incluyan quinolonas y epóxidos, estos compuestos se combinan con grupos sulfhidrilo (SH) a nivel del citoplasma o proteínas de membrana, ocasionando daños a nivel de material genético, lo cual puede provocar carcinogénesis. Por último el estrés oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno es otro mecanismo bien identificado, que se encuentra relacionado con el desarrollo de hepatotoxicidad **(Penner, 2012; Gonzales, 2010; Gates, 2010; Zanger, 2008)**.

Dentro de las funciones y estructuras celulares que se ven deterioradas a consecuencia de la toxicidad inducida por fármacos se pueden mencionar las siguientes: si se daña la membrana celular, esto genera la posibilidad de desarrollar necrosis celular, situación que origina un cuadro clínico de hepatitis

aguda o insuficiencia hepática fulminante; si el daño ocurre en la membrana a nivel del canalículo, comprometiendo a los transportadores de membrana, probablemente el cuadro clínico sea una colestasis. Si se produce estimulación enzimática a nivel de los organelos intracelulares, los fármacos formaran un complejo; originando uniones irreversibles, los cuales son englobados en vesículas, las cuales de presentarse a nivel de membrana servirían de estímulo para una reacción autoinmune; o estimular diferentes elementos de inflamación, como el factor de necrosis tumoral (NTF). Organelos como la mitocondria pueden presentar daño, generando la acumulación de grasa dentro del hepatocito que sería el mecanismo de síndrome de Reye **(Chavez, 2006)**.

Las afecciones hepáticas a consecuencia de los tratamientos con medicamentos se dividen en dos tipos: primarias y secundarias. Las primarias son consecuencia del aumento de los efectos farmacológicos, estos pueden ser el resultado de la formulación farmacéutica o de factores farmacocinéticos individuales, que pueden ser; efectos endócrinos (por ejemplo alteración en la hormona antidiurética, causada por carbamazepina), efectos metabólicos (metabolismo de calcio, ácido fólico, etc.), efectos neurológicos relacionados con la función cognitiva y conductual, entre otros. Por otra parte, las secundarias incluyen reacciones dermatológicas como erupciones cutáneas, síndrome de Stevens-Johnson, hemorragias, dermatitis, lupus eritematoso sistémico. **(Sell, 2003)**.

Existen síndromes clínicos de origen hepático secundarios al tratamiento crónico con fármacos, por ejemplo la elevación asintomática de las transaminasas hepáticas, la cual, se debe a una respuesta del tejido hepático originada por la exposición al medicamento debido a la sobre estimulación de las enzimas del CYP450 (**Fernández, 2008**). De igual manera, existe evidencia del desarrollo de hepatitis debida a necrosis hepatocelular, esteatosis hepática como consecuencia de la disfunción de diversas vías metabólicas (**Gutiérrez, 2010; Fernández, 2008; Moreira, 2006**). Otro síndrome que se presente es la hepatitis granulomatosa, está es típica de reacciones inmunitarias por hipersensibilidad asociada a fármacos, se caracteriza por la presencia de granulomas, que son una agregación central de células inflamatorias y epiteliales (**Rodríguez, 2002**). En los últimos años se ha sugerido que las reacciones adversas por el tratamiento con fármacos es responsable de un aumento en los casos de lesión en hígado, siendo la causa más común la muerte por fallo hepático agudo (**Tejada, 2010**).

### **3.8 Pruebas de Funcionamiento Hepático (PFH) y su relación con la hepatotoxicidad por fármacos**

Las PHF's, son utilizadas para evaluar la función hepática, dentro de este perfil se incluyen varios parámetros bioquímicos, cabe señalar, sólo las bilirrubinas miden la capacidad funcional del hígado, siendo los demás potenciales indicadores de daño hepático (**Hoekstra, 2013; Servillo, 2013; Atosoy, 2007; Frazer, 2007**) (Tabla 4).

Tabla 4. Abreviatura y nombre de los parámetros bioquímicos que se incluyen en las pruebas de funcionamiento hepático.

|     |                             |
|-----|-----------------------------|
| AST | Aspartato aminotrasferasa   |
| ALT | Alanino aminotrasferasa     |
| GGT | Gamaglutamil transpeptidasa |
| FA  | Fosfatasa alcalina          |
| Bil | Bilirrubina total           |
| BD  | Bilirrubina directa         |
| BI  | Bilirrubina indirecta       |

La AST, es una enzima con dos isoformas, una de localización mitocondrial y otro citoplasmático, tiene una vida media corta (2-4 días), no es específicamente hepática, ya que su actividad se encuentra repartida en diferentes tejidos corporales (hígado, corazón, músculo esquelético y eritrocitos) **(Hoekstra, 2013; Servillo, 2013; Atosoy, 2007; Thapa, 2007)**.

ALT es una enzima de localización citoplasmática, situándose el 90% de su actividad a nivel hepático, por lo que, se la puede considerar hepatoespecífica, es considerada el indicador más utilizado de enfermedad hepática. Puede presentar alteraciones en relación a necrosis hepática de diferentes causas como insuficiencia cardíaca, anoxia aguda, traumatismo, niveles de AST superiores a 450 U/L y de ALT mayores de 250 U/L son predictores de daño celular. Si existe necrosis hepática masiva la elevación de AST y ALT es todavía mayor y, en esta situación, una caída brusca de ambas enzimas suele ser de mal pronóstico. En hepatitis medicamentosas o tóxicas, los niveles de AST y ALT son muy variables, según predomine una forma necrótica o colestática. En caso de que exista una masa ocupante de espacio, sea de origen tumoral o no, es frecuente el aumento de AST y ALT de dos a tres veces el valor normal **(Hoekstra, 2013; Servillo, 2013; Atosoy, 2007; Frazer, 2007)**.

La FA es una enzima que está presente en la mayoría de los tejidos corporales, principalmente en el epitelio intestinal, osteoblastos e hígado, donde se halla en las membranas de las sinusoides y canalículos. Para confirmar el origen hepatobiliar de la fosfatasa alcalina se puede medir la concentración de otras enzimas procedentes del tracto biliar, en diagnóstico de colestasis la concentración de FA aumenta, debido a la obstrucción hepatobiliar, lo que trae como consecuencia una mayor síntesis enzimática en los hepatocitos adyacentes al canalículo biliar y por tanto una mayor cantidad de FA **(Hoekstra, 2013; Servillo, 2013; Frazer, 2007; Thapa, 2007)**.

Gamma glutamiltranspeptidasa (G-GT); pertenece a un grupo de enzimas que cataliza la transferencia de aminoácidos de un péptido a otro, su

concentración se eleva en la ictericia obstructiva, colecistitis o enfermedades infiltrativas. A pesar de tener una mayor sensibilidad diagnóstica, su especificidad es menor, ya que, su concentración en plasma aumenta también en otros tipos de lesión hepática (hepatitis infecciosa, hepatocarcinoma, esteatosis, etc.) aunque de forma moderada **(Hoekstra, 2013; Servillo, 2013; Frazer, 2007; Thapa, 2007)**.

Otra marcador bioquímico son las bilirrubinas, existen dos fracciones, la indirecta, cuya elevación puede ser debida a un aumento en la producción de pigmentos o a un trastorno en su captación por el hígado, y la directa, cuya elevación indica siempre un trastorno en la excreción.. Una hiperbilirrubinemia mixta se puede observar en hepatopatías agudas y crónicas. Por otro lado la bilirrubina puede encontrarse alterada en muchos tipos de enfermedad hepática o del tracto biliar o por razones inespecíficas **(Hoekstra, 2013; Servillo, 2013; Frazer, 2007; Thapa, 2007)**.

### **3.9 Hepatotoxicidad inducida por el tratamiento crónico de fármacos anticonvulsivantes y ansiolíticos**

La toxicidad por fármacos constituye un problema clínico relacionado no sólo directamente con la intervención médica. El síntoma más frecuente es una reacción hepatotóxica, la cual es frecuente ante el consumo prolongado de fármacos. El daño hepático por fármacos representa entre el 2 y 5% de los casos de ictericia, el 10% de las hepatitis agudas, además, representa aproximadamente el 25% de las causas de falla hepática fulminante en el adulto **(Marwick, 2012; Atosoy, 2007; Contreras, 2003; Zimmerman, 1995)**.

El síndrome de hipersensibilidad por fármacos anticonvulsivantes, es una reacción adversa asociada a medicamentos los cuales poseen radicales de tipo aromático con es el caso del fenobarbital, carbamazepina, tetraciclinas por mencionar algunos ejemplos **(Jelena, 2014; Abdel Salam, 2013; Amathieu; 2013; Stockis, 2013; Bjornsson, 2008)**. Este síndrome se caracteriza por la



presencia de fiebre, erupciones cutáneas y hepatitis primaria **(Jelena, 2014; Abdel Salam, 2013; Stockis, 2013; Scheurman, 2001)**. Se realizó un estudio en el cual se evaluó la toxicidad por tetraciclinas, reportando que, después de 96 horas de administración del tratamiento (dosis 25  $\mu$ M), se observó muerte celular a nivel hepático **(Jelena, 2014; Abdel Salam, 2013; Penner, 2012; Shen, 2009)**, otro ejemplo, es el ácido valproico, anticonvulsivante empleado en el tratamiento de varios trastornos neurológicos, del cual, se sabe que puede generar hepatotoxicidad originada por sus metabolitos **(Jelena, 2014; Abdel Salam, 2013; Penner, 2012; Lheureux, 2009)**.

El tratamiento farmacológico de la epilepsia está orientado a prevenir las crisis convulsivas tratando de no interferir con la función cerebral normal del individuo o causar efectos adversos indeseables. La farmacoterapia de esta patología implica la administración prolongada de fármacos anticonvulsivantes, sin embargo, existen reportes de que alrededor del 30% de los pacientes con epilepsia no responden a este tratamiento, esto, sumado a la alta incidencia de efectos adversos graves, así como, la tolerancia farmacológica hacen necesario el descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas con actividad anticonvulsivante que pudieran ser en un futuro una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad.

#### **4 Justificación**

En la terapéutica, el empleo de la mayoría de los medicamentos involucra riesgos para la salud de los pacientes. Estudios recientes han mostrado que la mayoría de los fármacos anticonvulsivantes, producen efectos no deseados, desde sueño, náuseas hasta insuficiencia hepática y pancreática, siendo la gran mayoría de éstos fármacos metabolizados a nivel hepático. Debido a que existe el antecedente, en el cual se demostró la eficacia anticonvulsivante del derivado triptofano (S)-2-(1,3-dihidroisoindol-2il)-3-(1*H*-indol-3-il)-propanoato de metilo, es necesario realizar un estudio en el cual se evalué su eficacia anticonvulsivante, así como, evaluar los posibles efectos hepatotóxicos al ser administrado de manera crónica en ratón macho de la cepa CD1.

#### **5 Hipótesis**

Los derivados de isoindolinas al ser administrados de manera crónica en ratón macho de la cepa CD1, mantienen su eficacia anticonvulsivante y no generan efectos hepatotóxicos significativos al ser administrados de manera crónica.

## **6 Objetivo general**

Evaluar el efecto anticonvulsivante del tratamiento crónico con derivado de isoindolinas y los posibles efectos hepatotóxicos en ratón macho de la cepa CD1.

### **6.1 Objetivos particulares**

Sintetizar, purificar y caracterizar por técnicas espectrométricas el derivado de isoindolina.

Evaluar el efecto anticonvulsivante del derivado de isoindolina y compararlo contra carbamazepina al ser administrados de manera crónica en ratón macho de la cepa CD1.

Evaluar el posible efecto hepatotóxico de la administración crónica del derivado de isoindolina y carbamazepina, mediante la cuantificación de enzimas hepáticas.

## **7 Materiales y métodos**

### **7.1 Reactivos**

Para la síntesis del derivado de isoindolina se emplearon clorhidrato del éster metílico de L-triptófano (Sigma-Aldrich),  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*o*-xileno (Sigma-

Aldrich), bicarbonato de potasio, como disolvente se utilizó acetonitrilo grado HPLC (Tedia). Para la evaluación de la actividad anticonvulsivante se empleó pentilentetrazol (PTZ) (Sigma-Aldrich) como agente convulsivante, como control farmacológico se administró Trepina (carbamazepina, Laboratorios Alpharma ®) el cual fue obtenido en una farmacia local. Para la eutanasia de los sujetos experimentales se administró una sobredosis vía intraperitoneal de Sedalpharma (pentobarbital sódico marca Petspharma).

## **7.2 Sujetos experimentales**

Para la evaluación de la actividad anticonvulsivante y el efecto hepatotóxico se utilizó una N= 106 ratones de la cepa CD1. Los sujetos experimentales se dividieron posteriormente en dos subpoblaciones de n= 53 para realizar cada la prueba biológica. Los sujetos experimentales tuvieron un peso entre 20 y 35 g, se mantuvieron en un bioterio de estancia en cajas de acrílico transparente con libre acceso a agua y alimento, con un ciclo de luz oscuridad de 12 h por 12 h, en donde la luz se encendía a las 7 h y se apagaba a las 19 h. Todos los experimentos y sujetos experimentales fueron realizados de acuerdo con los lineamientos éticos marcados en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999

### **7.3 Obtención y manejo de las muestras sanguíneas**

La extracción de sangre se llevó a cabo mediante punción cardíaca, en la cual se sometió al animal a anestesia profunda administrándose una dosis de 0.1 ml vía intraperitoneal de pentobarbital sódico, posteriormente, se colocó en posición ventral, la aguja fue insertada a través de la pared torácica lateral y espacios intercostales en la región de pulsación máxima del corazón (**Ortiz, 2003; Svendenson, 2000**). Las muestras sanguíneas se recolectaron en tubos BD Microtainer®, posterior a la obtención de las muestras estas fueron centrifugadas y se colocaron en copillas para su posterior estudio bioquímico, en caso de ser necesario su conservación, esta se hizo mediante congelación y sin exposición a la luz.

### **7.4 Determinación de las pruebas de funcionamiento hepático**

El análisis bioquímico se realizó en el ANALIZADOR VITROS 250, la tecnología de este equipo se basa en química seca, previo al procesamiento de las muestras se realizó el control de calidad diario del equipo y su respectiva calibración para cada uno de los analítos.

## 8 Procedimientos experimentales

### 8.1 Síntesis

Esta se realizó de acuerdo a lo reportado por **Mancilla en 2001 (Trejo Muñoz, 2014)**. En el esquema se muestra el mecanismo de reacción para la síntesis del derivado de isoindolina.

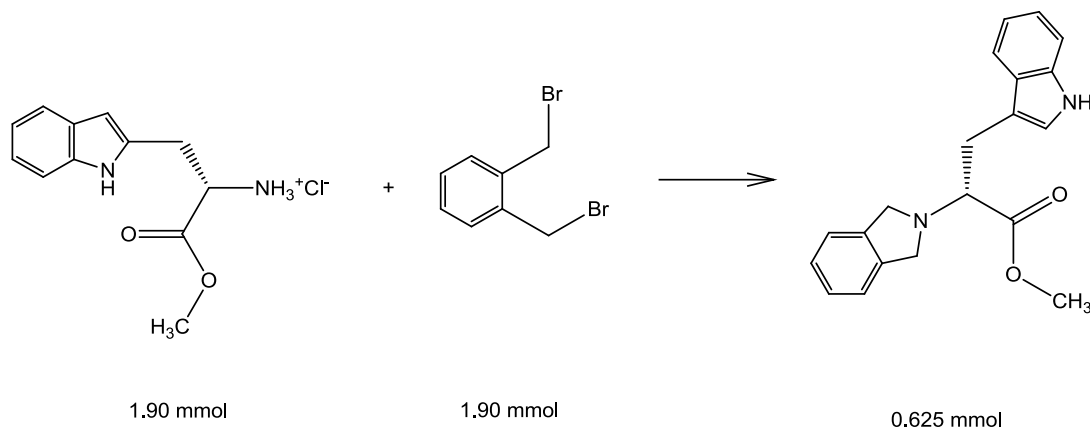


Figura 11. Ruta de síntesis del derivado de isoindolina

### 8.2 Caracterización

El derivado de isoindolina fue caracterizado mediante propiedades físicas como punto de fusión y técnicas espectroscópicas como RMN en el cual se empleó como disolvente  $\text{CDCl}_3$  para el espectro de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

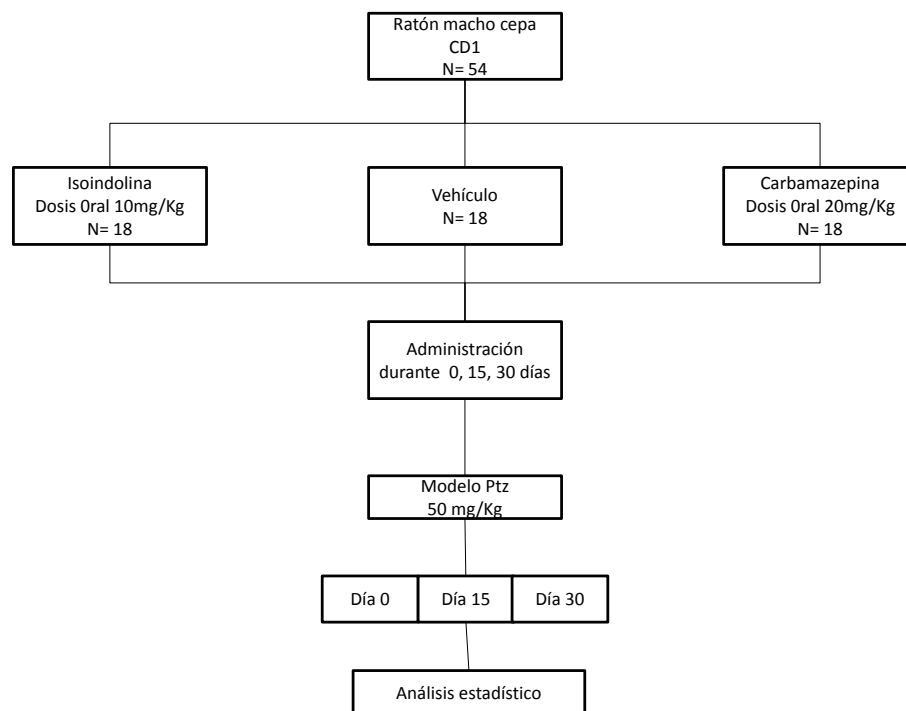
### **8.3 Evaluación de la actividad anticonvulsivante mediante el modelo de inducción química por PTZ**

El pentilentetrazol produce convulsiones del tipo tónico clónicas, las cuales fueron inducidas por una dosis única de 50mg/Kg vía intraperitoneal (1ml/Kg) **(Ramos-Morales, 2012; Obay, 2007; Pavlova, 2006)**.

Para llevar a cabo la evaluación del efecto anticonvulsivante, se formaron tres grupos experimentales para cada tratamiento (n= 18), los cuales a su vez fueron subdivididos en tres subgrupos (n= 6). Una vez formados los grupos experimentales se administraron durante 0, 15 y 30 días, cada 24 h y por vía oral carbamazepina como control farmacológico (CBZ 20 mg/Kg), dosis que de acuerdo con lo reportado en la literatura ha sido empleada en modelo de ratón para evaluar su eficacia anticonvulsivante) **(Patel, 2012; Löscher, 1997; Rempel, 1990)**, el derivado de isoindolina 10 mg/Kg **(Acosta-Hernández, 2009)**, dosis obtenida de una curva dosis respuesta elaborada en un trabajo previo (ver apéndice II) y propilenglicol como vehículo (1ml/Kg), empleado para disolver ambos compuestos. La eficacia anticonvulsivante fue evaluada los días 0, 15 y 30 respectivamente.

Previo a la administración de PTZ, los animales de cada grupo de trabajo fueron colocados de manera individual en cajas de acrílico transparente para recibir la dosis correspondiente para cada grupo experimental. Pasada 1 h de la administración de cada sujeto, a cada individuo se le administró una dosis única e 50 mg/Kg vía intraperitoneal de PTZ. Las variables a evaluar durante la prueba conductual fueron: latencia (tiempo en segundos en que se presenta la crisis convulsiva), duración y tiempo de recuperación a la crisis convulsiva (segundos). Las sesiones conductuales fueron evaluadas por dos o más observadores independientes, mismas que fueron videograbadas para determinar que las mediciones fueran las adecuadas, la medición de los tiempos se llevaron a cabo con cronómetros digitales independientes para cada sujeto. Durante los procedimientos experimentales los animales se manejaron de acuerdo a las normas éticas internacionales **(ILAE, 2010, 1989)**.

En el siguiente diagrama se resume la fase experimental de la evaluación anticonvulsivante de la administración crónica del derivado de isoindolina y carbamazepina (Figura 12).



Para evaluar el posible efecto hepatotóxico, se formaron tres grupos experimentales para cada tratamiento (n= 18), los cuales a su vez fueron subdivididos en tres subgrupos (n= 6). Una vez formados los grupos experimentales se administraron durante 0, 15 y 30 días, cada 24 h y por vía oral carbamazepina (CBZ 20 mg/Kg) (**Patel, 2012; Löscher, 1997; Remmel, 1990**), 10 mg/Kg del derivado de isoindolina (**Acosta-Hernández, 2009**), y propilenglicol como vehículo (1ml/Kg). La obtención de las muestras sanguíneas se llevaron a cabo 24 h después de terminado cada tratamiento (Figura 13).



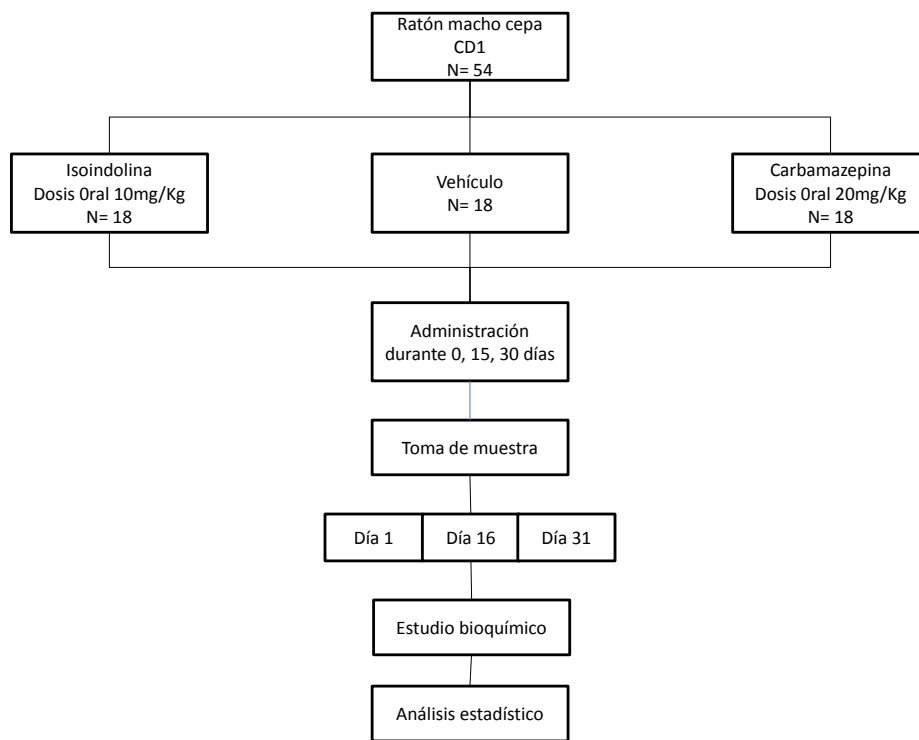


Figura 13. Diagrama de trabajo para la evaluación de las pruebas de funcionamiento hepático posterior a la administración crónica de isoindolina y carbamazepina.

#### 8.4 Modelos estadísticos

Las variables evaluadas en el modelo PTZ debido a que no cumplían con los supuestos de normalidad y homogeneidad, se analizaron mediante una ANOVA de 2 vías en el módulo de Modelos Lineales Generalizados con sobredispersión de datos debido a que presentan una distribución Poisson utilizando el paquete estadístico JMP 6.0.0 2005. Los resultados son mostrados como el promedio  $\pm$  E.E. Cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) se realizó la prueba post-hoc de comparaciones múltiples, en la cual, las variables independientes fueron los factores tiempo y tratamiento.

Las variables evaluadas en el modelo de hepatotoxicidad fueron analizadas con una ANOVA paramétrica de dos vías cuando los datos pasaron los supuestos

de normalidad y homogeneidad de varianzas. Para aquellos datos que no cumplieron dichos supuestos, se utilizó una transformación a log 10, con el mismo diseño, utilizando el programa Sigmastat 3.5 para Windows. Build 3.5.0.54.2006, graficando medias  $\pm$  E. E. Para el caso específico de las bilirrubinas se utilizó un modelo lineal generalizado con una distribución *poisson* debido a la existencia de ceros en la base de datos, graficando medias  $\pm$  I. C. al 95%. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas, cuando  $p < 0.05$  aplicando la prueba post-hoc de Tukey. Las gráficas para ambos modelos biológicos se realizaron con el paquete estadístico SigmaPlot para Windows Versión 10.0 Build 10.0.0.54. 2006.

## 9 Resultados

### 9.1 Síntesis

Se obtuvo un rendimiento experimental del 40% (200mg) del compuesto puro ((*S*)-2-(1,3-dihidroisoindol-2il)-3-(1*H*-indol-3-il)-propanoato de metilo). El compuesto posee un punto de fusión de 100°C.

### 9.2 Caracterización

El derivado de isoindolina es un sólido de color marrón, soluble en compuestos orgánicos. El espectro de protón muestra señales características del compuesto, una señal simple del grupo OCH<sub>3</sub> y para el sistema AB el anillo de protones del metileno CH<sub>2</sub>N, lo cual concuerda con lo reportado por Mancilla en 2001, experimentalmente se observaron los siguientes desplazamientos químicos:  $\delta$  8.75 (s 1H), 7.71 (d, 1H, J = 7.3), 7.3 (s, 5H), 7.21-7.20 (br d, 3H), 6.92 (br, 1H), 4.32 (d, 1H, J = 11.4), 4.26 (d, 1H, J = 11.4), 3.97 (dd, 1H, J = 6.2, J = 8.6), 3.44 (dd 1H, J = 14.5, J = 8.6), 3.35 (dd, 1H, J = 14.5, J = 6.2).

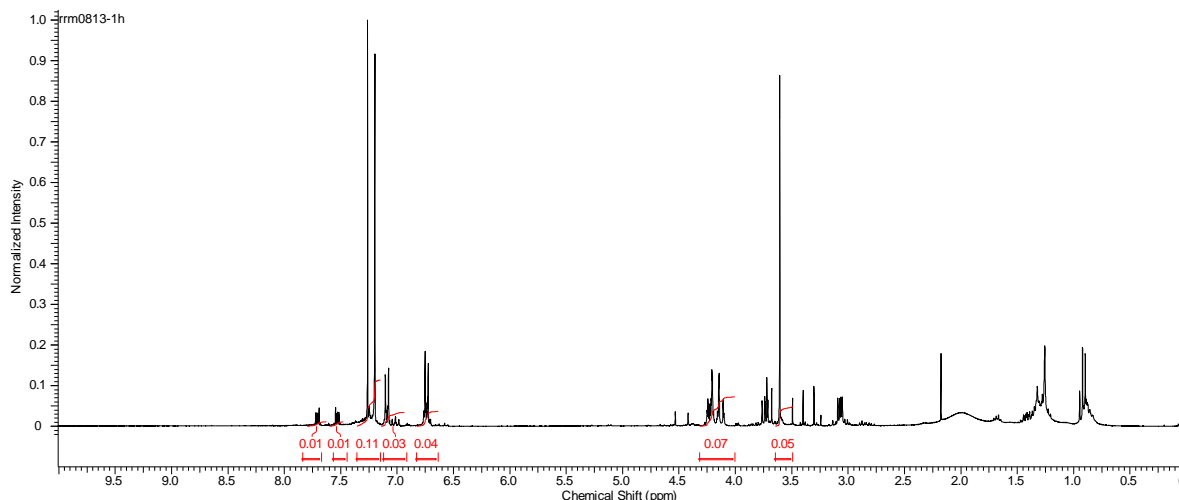


Figura 15. Espectro de <sup>1</sup>H obtenido experimentalmente para el derivado de isoindolina.

Para el espectro de  $^{13}\text{C}$  se observaron los siguientes desplazamientos químicos:  $\delta$  26.99 (C11); 51.50 (OCH<sub>3</sub>); 55.68 (C1, C3); 65.85 (C10); 111.07 (C12); 111.30 (C19); 118.36 (C16); 119.18 (C17); 121.78 (C18); 122.24 (C5, C8); 122.53 (C13); 126.65 (C6, C7); 127.22 (C15); 135.88 (C20); 139.10 (C4, C9); 172.84 (C=O).

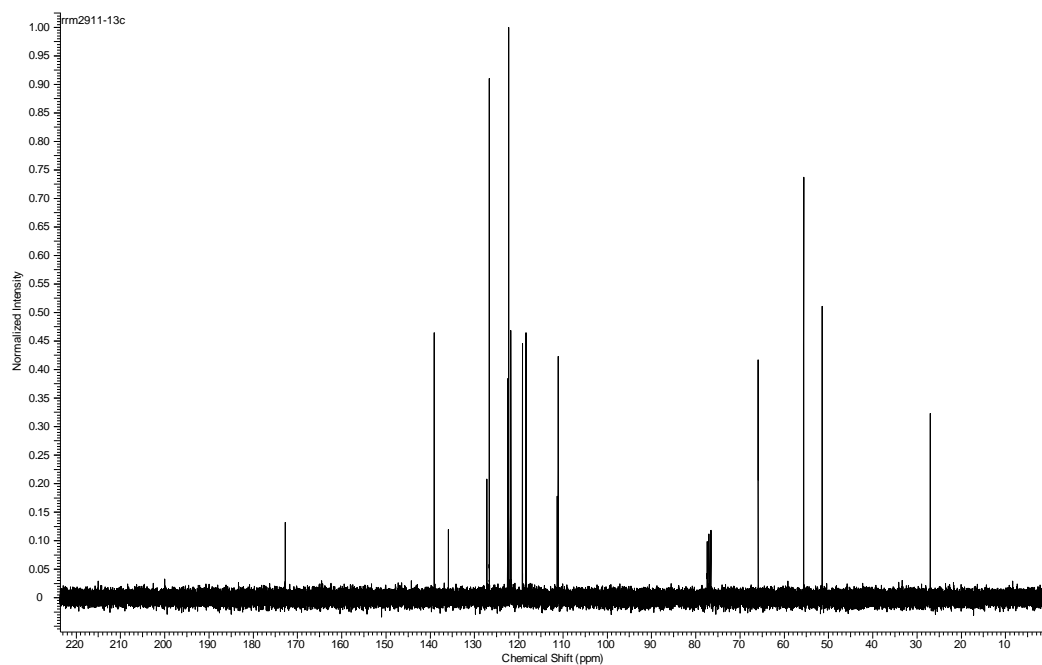


Figura 16. Espectro de  $^{13}\text{C}$  obtenido experimentalmente para el derivado de isoindolina.

### **9.3 Evaluación del efecto anticonvulsivante posterior al tratamiento crónico del derivado de isoindolina en comparación con carbamazepina**

La latencia ( $\chi^2_{53}= 1.34$ ,  $p= 0.51$ ), duración ( $\chi^2_{53} = 0.84$ ,  $p= 0.35$ ) y recuperación ( $\chi^2_{53}= 1.20$ ,  $p= 0.54$ ) a la crisis convulsiva, determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas con respecto a la variable tiempo. Para el factor tratamiento, se encontraron diferencias estadísticas al reducir los tiempos de latencia, ( $\chi^2_{53}= 18.56$   $p= <0.001$ ), duración ( $\chi^2_{53}= 16.59$   $p= <0.001$ ) y recuperación ( $\chi^2_{53}= 19.55$   $p= <0.001$ ) a la crisis convulsiva.

Para el factor tratamiento, se encontraron diferencias significativas para la variable de latencia a la crisis convulsiva, entre los grupos experimentales isoindolina ( $\chi^2_{53}= 6.35$ ,  $p= <0.05$ ) con respecto a carbamazepina ( $\chi^2_{53}= 17.7$ ,  $p= <0.001$ ) y contra vehículo. Para la variable de duración, se encontraron diferencias estadísticas entre el tratamiento isoindolina con respecto a carbamazepina ( $\chi^2= 12.45$ ,  $p= <0.05$ ) e isoindolina ( $\chi^2_{53}= 14.50$ ,  $p= 0.001$ ) con respecto al grupo vehículo. De igual manera para la variable de tiempo de recuperación, existen diferencias estadísticas entre los grupos isoindolina ( $\chi^2_{53}= 18.96$ ,  $p= <0.001$ ) respecto a carbamazepina e isoindolina ( $\chi^2_{53}= 10.82$ ,  $p= <0.001$ ) con respecto al grupo vehículo. En la figura 17A se representan los tiempos de latencia a la convulsión para los diferentes tratamientos. Para la figura 17B se observan los tiempos de duración a la crisis convulsiva y en la figura 17C se muestran los tiempos de recuperación a la crisis convulsiva para los diferentes tratamientos.

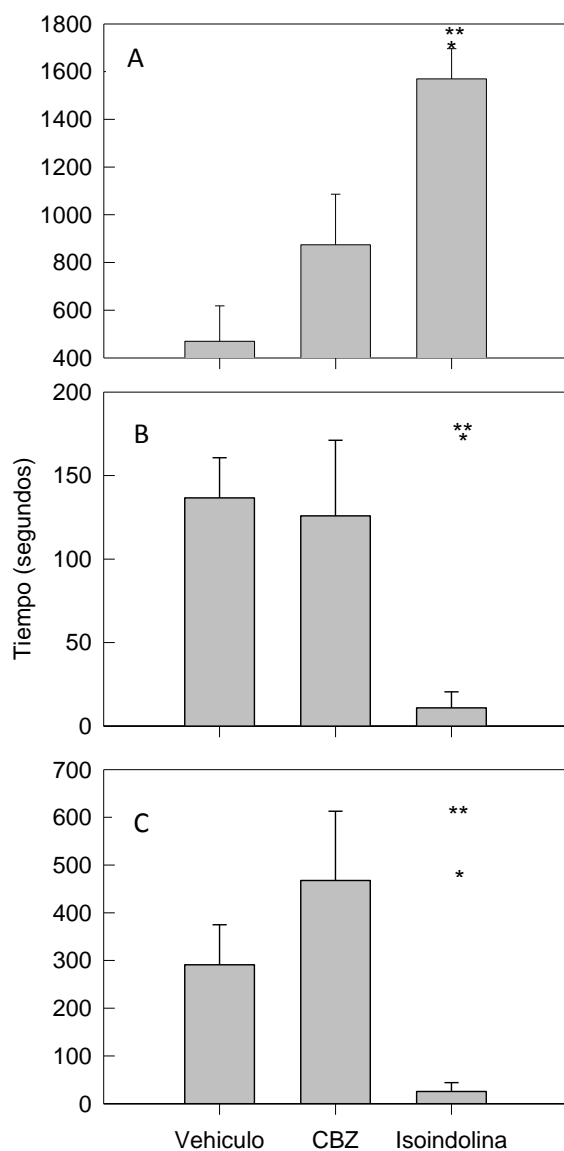


Figura 17. Efecto de los tratamientos sobre las variables tiempo de latencia (17A), duración (17B) y recuperación (17C) a la crisis convulsivas inducidas por PTZ en ratones macho CD1. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E.,  $n= 18$  ratones por tratamiento. \* $p < 0.05$  vs carbamazepina; \*\* $p < 0.001$  vs vehículo. Se observan diferencias estadísticas para todas las variables de respuesta entre los tratamientos entre isoindolina comparadas con carbamazepina y vehículo.

Finalmente se contrastaron las diferencias entre los tratamientos para evaluar la eficacia del derivado de isoindolina mediante una tabla de contingencia en el módulo de Modelos Lineales Generalizados Unifactorial con distribución binomial, donde 0 representó que no hubo convulsión y 1 la presencia de crisis convulsiva. Graficando las medias  $\pm$  E.E. Este análisis justifica la diferencia entre tratamientos ( $\chi^2_2 = 18.7$ ,  $p = < 0.0001$ )

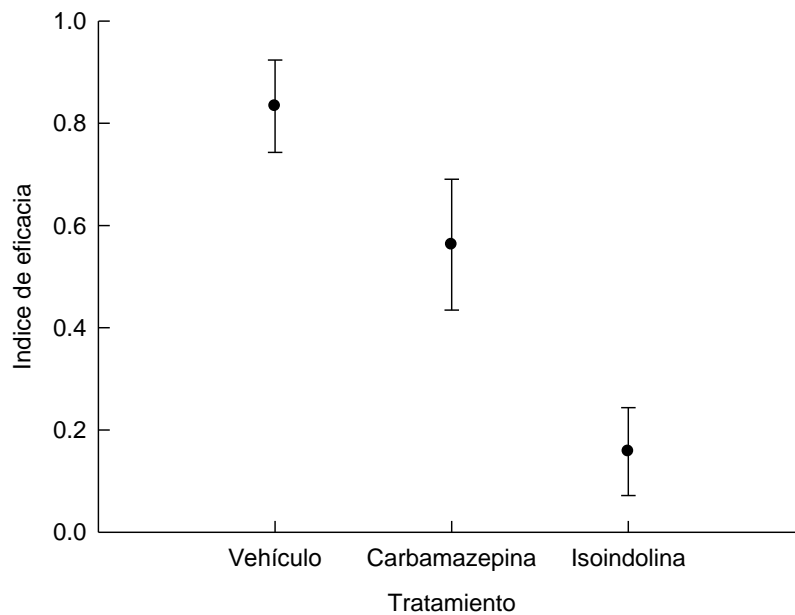


Figura 18. Índice de eficacia anticonvulsivante de los diferentes tratamientos. Se puede observar que el derivado isoindolina posee un mayor efecto protector a la aparición de la crisis convulsiva en el modelo de PTZ comparado con carbamazepina y vehículo. Considerando que 0 es no convulsión y 1 la presencia de la crisis.

#### 9.4 Evaluación del efecto hepatotóxico mediante la valoración de PFH.

Para la variable AST, el análisis estadístico determinó que existen diferencias estadísticamente significativas para el día 0 de tratamiento entre Iso ( $F_{(15,0.05)}= 5.03$ ,  $p= 0.020$ ) con respecto a CBZ. Para el los días 15 ( $F_{(15, 0.05)}= 2.38$ ,  $p=0.132$ ) y 30 ( $F_{(17,0.05)}= 2.05$ ,  $p= 0.163$ ) de tratamiento no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales (Figura 19).

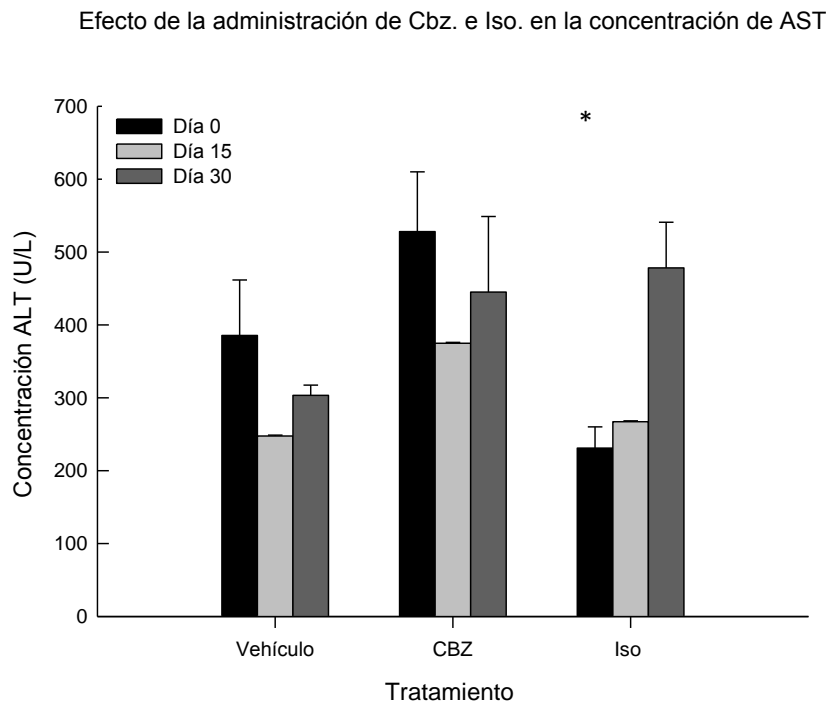


Figura 19. Muestra el efecto de la administración crónica de CBZ. e Iso. en las concentraciones de AST. Existiendo diferencias significativas entre los grupos del Día 0 entre Iso con respecto a CBZ.  $p<0.05$  (\*). Los resultados son mostrados como el promedio  $\pm$  E.E.



Para la enzima ALT (Figura 20), el análisis estadístico determinó que existen diferencias significativas en el día 0, entre Iso ( $F_{(15,0.05)}= 5.05$ ,  $p= 0.024$ ) respecto a Vehículo e Iso ( $F_{(15,0.05)}= 5.05$ ,  $p= 0.024$ ) con respecto a CBZ., Para el día 15 ( $F_{(14, 0.05)}= 0.498$ ,  $p=0.620$ ) y 30 ( $F_{(17,0.05)}= 0.370$ ,  $p= 0.697$ ) de tratamiento el análisis estadístico no mostro diferencias significativas entre los grupos experimentales.

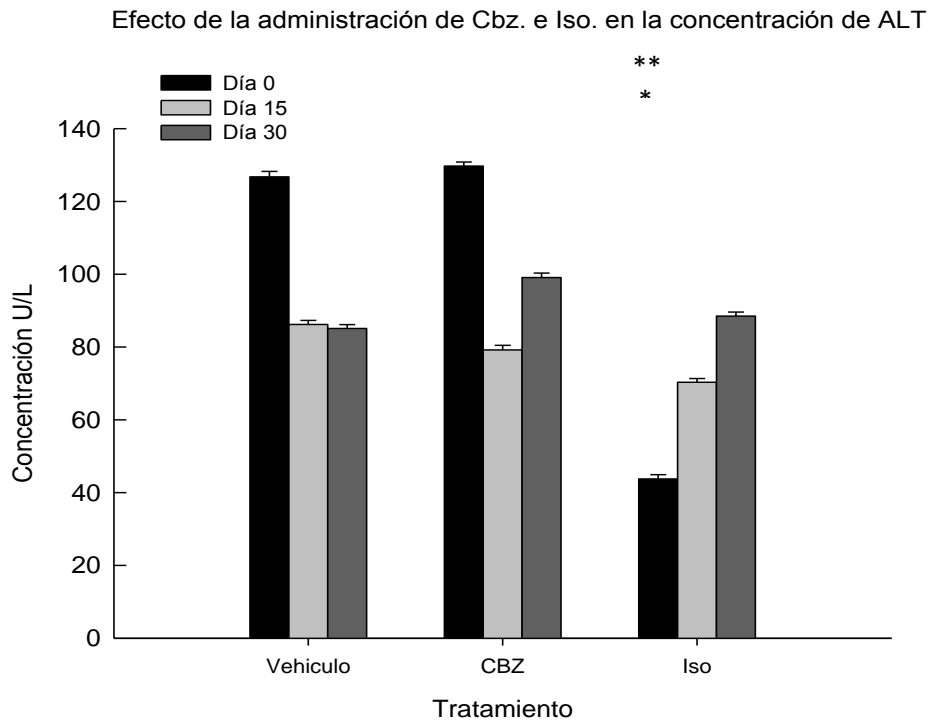


Figura 20. Efecto de la administración crónica de CBZ e Iso en la concentración de ALT. El análisis estadístico determinó que existen diferencias estadísticas para el día 0 de Iso con respecto a CBZ.  $p<0.05$  (\*). Los resultados son mostrados como el promedio  $\pm$  E.E.

Para la variable FA el análisis estadístico mostró que no existen diferencias estadísticas entre los grupos experimentales para el día 0 de tratamiento ( $F_{(15,0.05)}= 2.782$ ,  $p= 0.099$ ). De igual manera para el día 15 ( $F_{(15,0.05)}= 2.070$ ,  $p= 0.166$ ) de tratamiento no existieron diferencias significativas entre los diferentes grupos de trabajo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los

grupos de día 0 de tratamiento y día 15. Para el día 30 de administración se observan diferencias estadísticas entre el grupo de Vehículo con respecto a CBZ ( $F_{(16, 0.05)} = 7.820$ ,  $p=0.022$ ) e Iso ( $F_{(16, 0.05)} = 7.820$ ,  $p=0.006$ ) (Figura 21).

Efecto de la administración de CBZ. e Isoindolina en la concentración de ALKP

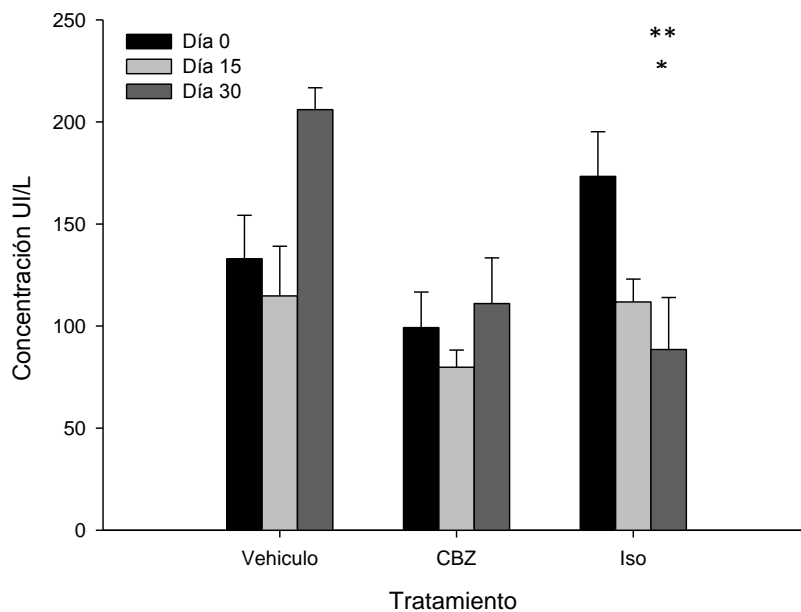


Figura 21. Efecto de la administración crónica de CBZ e Iso en la concentración de FA. Existen diferencias estadísticas entre Vehículo contra CBZ y Vehículo con respecto a Iso en el día 30 de administración, donde  $p < 0.05$  (\*) y  $p < 0.01$  (\*\*). Los resultados son mostrados como el promedio  $\pm$  E.E.

El análisis estadístico mostró que para la bilirrubina total (Figura 22), no existen diferencias significativas entre los grupo experimentales para el día 0 de tratamiento ( $F_{(15,0.05)}= 2.273$ ,  $p= 0.142$ ); de igual manera para el día 15 de administración ( $F_{(14, 0.05)}= 1.608$ ,  $p=0.238$ ). Sin embargo, para el día 30 de tratamiento existen diferencias significativas entre el grupo Vehículo con respecto a CBZ y Vehículo contra Iso donde ( $F_{(17,0.05)}= 27.893$ ,  $p= <0.001$ ) en ambos casos.

Efecto de la administracion de CBZ. e Isoindolina en la concentracion de TBIL

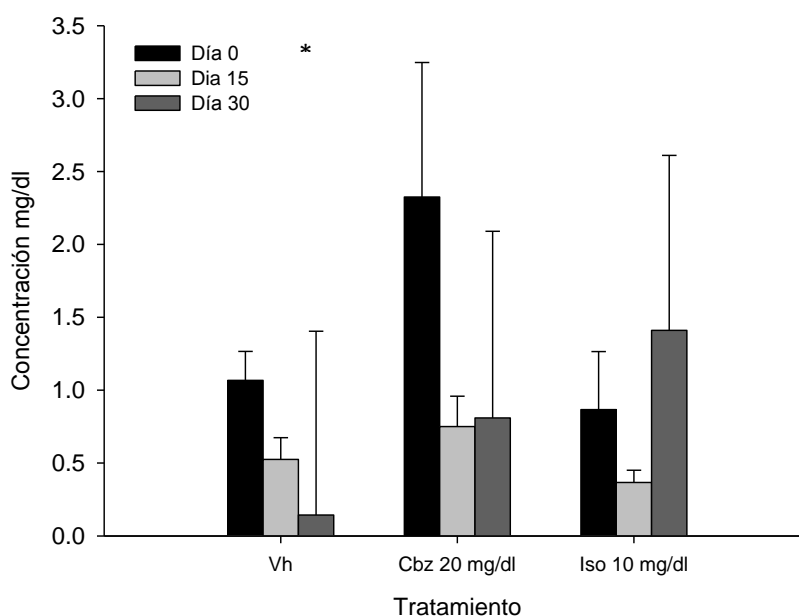


Figura 22. Se muestra el efecto de la administración crónica de CBZ e Iso en la concentración de TBIL. No existiendo diferencias estadísticas para los días 0 y 15 de tratamiento. Para el Día 30 se observan diferencias entre Vehículo y CBZ Vehículo, donde  $p= <0.001$  para ambos casos (\*). Los datos se muestran como las medias  $\pm$  IC 95%.

Para el caso de la bilirrubina indirecta (Figura 23) el análisis estadístico determinó que no existen diferencias significativas entre los grupos diferentes grupos experimentales y durante el tiempo de tratamiento, ( $\chi^2_{(2, 0.05)}= 0.0104$ ,  $p= 0.994$ ). Si bien no existen diferencias estadísticas se puede observar que para el

día 30 de tratamiento los sujetos experimentales del grupo CBZ muestran una mayor concentración de este analíto.

Efecto del tratamiento en las concentraciones de la enzima de BU/BI

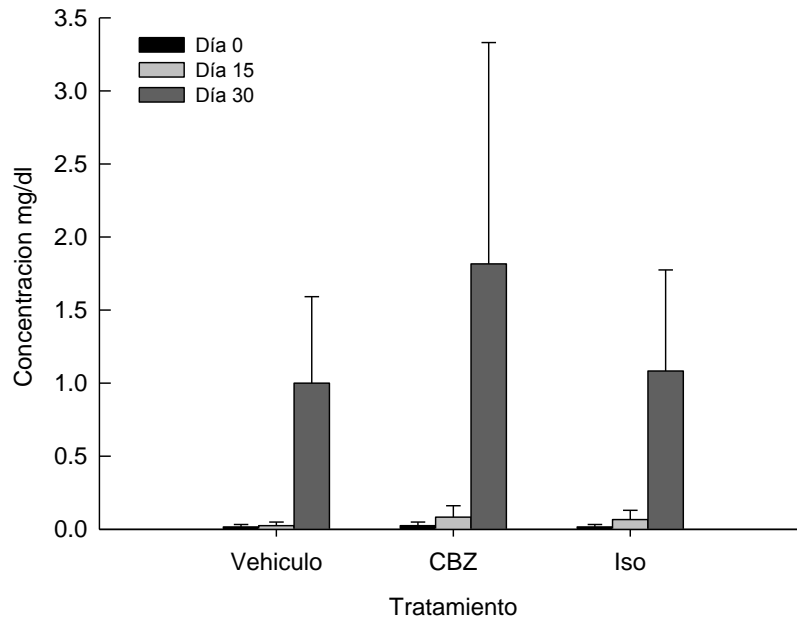


Figura 23. Efecto de la administración crónica de CBZ. e Iso, en la concentración de BI o no conjugada. El análisis estadístico determinó que no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales o el tiempo de tratamiento. Los resultados son mostrados como las medias  $\pm$  IC 95%.

El análisis de datos para el caso de la bilirrubina conjugada no mostró diferencias estadísticamente significativas (Figura 24) entre los diferentes grupos experimentales para los días 0, 15 y 30 ( $\chi^2_{(2, 0.05)} = 0.9023$ ,  $p = 0.6368$ ) de tratamiento. Sin embargo para el día 30 los sujetos experimentales del grupo de carbamazepina se observa una concentración por arriba con respecto al grupo Vehículo e Iso.

Efecto de el tratamiento en las concentraciones de la enzima de BU/BD

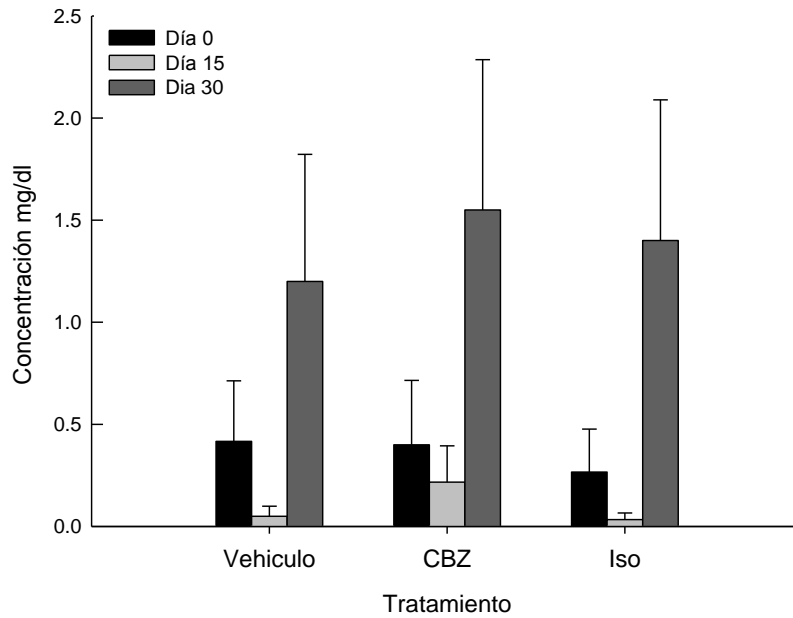


Figura 24. Efecto de la administración crónica de CBZ. e Iso. en la concentración de BC o conjugada. El análisis estadístico determinó que no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales o el tiempo de tratamiento. Los resultados son mostrados como las medias  $\pm$  IC 95%.

## 11. Discusión

Los resultados obtenidos en el modelo biológico, muestran que la actividad anticonvulsivante del derivado de isoindolina fue mayor comparado con carbamazepina en el modelo PTZ al aumentar el tiempo de latencia y reducir los tiempos duración y recuperación a la crisis convulsiva, a pesar de que carbamazepina es un fármaco de primera elección para el tratamiento de crisis tónico-clónicas **(FDA, 2013; Acosta-Hernández, 2009)**.

Si bien, los fármacos anticonvulsivantes muestran diferencias en la respuesta farmacológica entre pacientes e incluso dentro de un mismo individuo, las cuales son determinantes para la respuesta al tratamiento **(Johannessen, 2012)**. De acuerdo con los estudios realizados en nuestro grupo de trabajo, previamente se emplearon como sujetos experimentales ratas macho de la cepa Wistar, pudiendo observar que en este trabajo el efecto protector del compuesto es reproducible en otra especie de modelo murino al utilizar ratones macho de la cepa CD1: Si bien existen diferencias metabólicas entre las diversas especies de mamíferos las cuales pueden modificar el efecto biológico de los fármacos, la reproducibilidad de estos resultados en dos especies diferentes podrían ayudar a predecir el efecto biológico que pudiera presentarse en humanos, debido a que los modelos animales sirven de base para el desarrollo de nuevas moléculas con actividad biológica **(Martignoni, 2006; Jensen-Seaman, 2004)**.

Analizando la eficacia del compuesto comparada con carbamazepina la dosis empleada del control farmacológico fue de 20 mg/Kg, lo que corresponde a 84.64  $\mu\text{M}/\text{Kg}$ , mientras que, para el derivado de isoindolina la dosis utilizada (10 mg/Kg) corresponde a 31.21  $\mu\text{M}/\text{Kg}$ . Considerando las equivalencias molares se determinó que las dosis no son bioequivalentes demostrando que el derivado de isoindolina presenta una mayor potencia y eficacia ya que se emplea una dosis menor tanto en peso como en el número de moléculas administradas **(Hales, 2006; Ahumada Vázquez, 2003)**.

Diversos estudios muestran que carbamazepina durante tratamientos crónicos puede generar efectos adversos que incluyen leucopenia, agranulocitosis, anemia aplástica, hiponatremia, alteraciones en el metabolismo de vitamina D, fatiga, desorientación, visión doble, ataxia, náuseas, vómito y hepatitis **(Higuchi; 2012; Kalapos; 2002; Pellock, 1987; Porter; 1987; Keränen, 1983)**. En el modelo de hepatotoxicidad se observa un incremento en la concentración de la enzima AST para el día 30 del grupo carbamazepina lo que de acuerdo con la literatura, pudiera sugerir una hipertransaminasemia debido a una lesión hepática, inflamación, hepatitis de origen viral o por toxicidad **(Sánchez, 2004)**. Por otra parte, para la enzima FA, el grupo de carbamazepina muestra una menor concentración con respecto al grupo vehículo e isoindolina en el día 30 de tratamiento, sin embargo, se han reportado valores de bajos FA y niveles altos de AST, los cuales se han relacionado con algunas patologías entre ellas hepatitis. **(Alonso, 2013; Sedky, 2012; Dufour, 2005)**.

Con respecto a las concentraciones de las bilirrubinas total, directa e indirecta, se observa que, los valores del día 30 del grupo de carbamazepina se encuentran más elevados con respecto a vehículo e isondolina. Se ha reportado que dentro de las causas más importantes para la hiperbilirrubinemia indirecta están la hepatitis por drogas, sobreproducción por hemólisis, eritropoyesis ineficaz, anemias causada por deficiencia de vitamina B12, ácido fólico y fierro. Otra causa probable un daño a nivel celular, en la cual el hepatocito disminuye su capacidad en la captación y almacenaje de bilirrubina o por una deficiencia de la enzima glucoronil transferasa. Existen reportes que indican que este aumento puede ser secundaria al tratamiento farmacológico, por último, el aumento en la concentración bilirrubina directa puede deberse a una disminución en la conjugación de bilirrubina originada por una alteración en la excreción intrahepática debida a desórdenes hereditarios; alteraciones en la excreción como hepatitis de diversas etiologías; y obstrucción biliar extrahepática **(Higuchi, 2012; Sedky, 2012; MacDougal, 2011)**. De acuerdo con lo anterior, a los 30 días de tratamiento, los sujetos experimentales del grupo de carbamazepina pudieran

presentar una hepatitis secundaria al tratamiento farmacológico, justificado por la alteración de en la concentración de la enzima AST, FA y bilirrubinas.



## 11. Conclusiones

El derivado de isoindolina mostró poseer mayor eficacia y potencia biológica al ser administrado de manera crónica en ratones macho de la cepa CD1 comparada con carbamazepina, al mostrar el mismo efecto protector en el modelo PTZ tanto en el día 0 como al día 30 del tratamiento.

En el modelo de hepatotoxicidad los resultados indican que el derivado de isoindolina al ser administrada de manera crónica no produce alteraciones bioquímicas significativas que pudieran indicar daño hepático secundario al tratamiento.

Se ha reportado que muchos de los fármacos que actúan a nivel de SNC generan tolerancia farmacológica, como es el caso de las benzodiazepinas, la cual es la reacción más frecuente tras la administración repetida del fármaco la cual se traduce en una disminución del efecto biológico esperado, la cual se compensa generalmente incrementando la dosis. Los resultados muestran que el derivado de isoindolina presenta el mismo efecto anticonvulsivante en los días 0, 15 y 30 del experimento lo cual sugiere la dosis administrada tiene el mismo efecto biológico durante todo el tratamiento, lo cual indica que no se genera tolerancia secundaria a la administración repetida del compuesto ni cambios adaptativos a nivel de receptores en el sitio de acción que modifiquen la actividad biológica. De acuerdo a lo anterior, el derivado de isoindolina sigue siendo una molécula viable para estudios posteriores que evalúen la toxicidad en otros sistemas biológicos con la finalidad de que pueda ser considerado un prospecto alternativo para el tratamiento de las crisis convulsivas.

## 12 Propuestas

- Evaluar la actividad anticonvulsivante en el modelo de MES, en el cual las crisis convulsivas se presenten de manera espontánea para evaluar el efecto protector en un modelo biológico distinto.
- Dada la reproducibilidad de los resultados entre especie, evaluar la variabilidad entre género utilizando ratas y ratones hembras controlando el ciclo estral.
- De acuerdo al protocolo de OECD y de la ADD evaluar los posibles efectos neurotóxicos del derivado de isoindolina, así como, los posibles efectos teratogénicos.

### 13 Bibliografía

- 1.- Abdel-Hafez AA. Synthesis and Anticonvulsant Evaluation of N-Substituted-Isoindolinedione Derivatives. Arch. Pharm. Res. 2004, Vol 27, No 5, 495-501.
- 2.- Abdel-Salam OM, Mohammed NA, Sleem AA, Farrag AR. The effect of antidepressant drugs on thioacetamide-induced oxidative stress. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013 Mar;17(6):735-44.
- 3.- Acosta-Hernández ME. Evaluación del efecto anticonvulsivante de isoindolinas-2-substituidas (S)-2-(isoindolin-2-il)-4-metiltiobutanoato de metilo, (S)-2-(isoindolin-2-il)-3-fenilpropanoato de metilo y (S)-3-(1*H*-indol-3-il)-2-(isoindolin-2-il)propanoato de metilo en ratas de la cepa Wistar. Tesis de Maestría. Universidad Veracruzana. 2009.
- 4.- Ahumada Vázquez JI. Farmacología práctica para las diplomaturas de Ciencias de la salud: (enfermería, Fisioterapia, Podología). Ediciones Días Santos, 2003. Madrid, España.
- 5.- Aichhorn W, Whitworth AB, Weiss EM, Marksteiner J. Second-generation antipsychotics: is there evidence for sex differences in pharmacokinetic and adverse effect profiles? Drug Saf. 2006, 29(7):587-98.
- 6.- Al-Soud YA and Al-Masoudi NA. Synthesis and antitumor activity of some new phthalimide analogues. Pharmazie. 2001, 56, 372-375.
- 7.- Alibiadi A, Gholamine B, Karimi T. Synthesis and antiseizure evaluation of isoindoline-1,3-dione derivatives in mice. Medicinal Chemistry Research. 2014;23(6), 2736-2743.
- 8.- Amathieu R, Levesque E, Merle JC, Chemit M, Costentin C, Compagnon P, Dhonneur G. Severe toxic acute liver failure: etiology and treatment. Ann Fr Anesth Reanim. 2013;32(6):416-21.

- 9.- Amin A, Gholamine B, Karimi T. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some novel isoindole-1,3-dione derivatives. *Pharma Chemica*. 2013; 5(5), 97-108
- 10.- Ananthan S. Preparation of urea and amide derivatives of aminoalkylpiperazines as partial agonist or antagonist of dopamine D2/D3 receptors. *PTC Int Appl*. 2014, WO 2014059265 A1 2014417.
- 11.- Anderson, G.D. Gender differences in pharmacological response. *Int Rev Neurobiol*. 2008, 83:1-10.
- 12.- Atasoy N, Erdogan A, Yalug I, Ozturk U, Konuk N, Atik L, Ustundag Y. A review of liver function tests during treatment with atypical antipsychotic drugs: a chart review study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007; 15;31(6):1255-60.
- 13.- Ayala GF, Dichter M; Gumnit RJ; Matsumoto G; Spencer WA. Genesis of epileptic interictal spikes: New knowledge of cortical feedback systems suggests a neurophysiological explanation of brief paroxysms. *Brain Res*. 1973; 52: 1-17.
- 14.- Bamagous G. Characterisation of response to antiepileptic drugs. PhD thesis. 2010.
- 15.- Baños i Díez. *Farmacología Ocular*. Ediciones UPC, 2002.
- 16.- Bafna AR, Mishra SH. Effect of Methanol extract of *Achyranthes aspera* linn. On riphampicin-induced hepatotoxicity in rats. *Ars Pharm*. 2004; 45(4): 343-351.
- 17.- Beierle I, Meibohm B, Derendorf H. Gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 1999, 37(11):529-47.
- 18.- Bell GS, Sander JW. The epidemiology of epilepsy: the size of the problem. *Seizure*. 2001, 10, 306-316.

- 19.- Ben-Menachem E. Medical management of refractory epilepsy-Practical treatment with novel antiepileptic drugs. *Epilepsia*. 2014. Volume 55, Issue Supplement s1, pages 3-8.
- 20.- Berger D, Citarella R, Dutia M, Grenberger L, Hallet W, Poweel D. Novel multidrug resistance reversal agents. *J Med Chem*. 1999, 42:2145–2161.
- 21.- Bhat S, Dao DT, Terrillon CE, Arad M, Smith RJ, Soldatov NM, Gould TD. CACNA1C (Ca<sub>v</sub> 1.2) in the pathophysiology of psychiatric disease. *Progress in Neurology*. 2012, 99, 1-14.
- 22.- Bjornsson E. Hepatotoxicity associated with antiepileptic drugs. *Acta Neurol Scand*. 2008, 1-10.
- 23.- Bottegoni G, Kufareva I. A new method for ligand docking to flexible receptors by dual alanine scanning and refinement. *J. Comput. Aided. Mol. Des*. 2008
- 24.- Brodie MJ, French JA, Mcdonald SA, Lee WJ, Adams B, Scott A, Nohria V, DeRossett S. Adjunctive use of ezogabine/retiabine with either traditional sodium channel blocking antiepileptic drugs (AEDs) or AEDs with other mechanisms of action: Evaluation of efficacy and tolerability. *Epilepsy Researche*. 2014. Epub ahead.
- 25.- Brodie MJ., Ditcher MA. Antiepileptic Drugs. *The New England Journal of Medicine*. 1997, 334 (24): 168-175.
- 26.- Buenafe OE, Orellana-Paucar A, Maes J, Huang H, Ying X, De Borggraeve W, Crawford AD, Luyten W, Esguerra CV, de Witte P. Tanshiones IIA exhibits anticonvulsant activity in zebra fish and mouse seizure models. *ACS Chem Neurosci*. 2013 Nov 20;4(11):1479-87.
- 27.- Buttioni A., Tommasini R., Preclinical studies on indoprofen, a new non-steroidal analgesis-antiinflammatory agent. *Eur. J. Rheumatol. Inflamm*. 1981, 4 (1): 3-10.

28.- Casanovas J. La Modelización Molecular como Herramienta para el Diseño de Nuevos Polímeros Conductores. *Polímeros: Ciencia Y Tecnología*. 2005. Vol 15. No 4, 239-244.

29.- Cascino GD, Sirven JI, Britton JW, Zakaria TM, Benarroch E. Mechanisms of Action of Antiepileptic Drugs. *Adult Epilepsy*. 18 MAR 2011. DOI: 10.1002/9780470975039.ch9

30.- Center for Disease and Control and Prevention. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. Targeting Epilepsy Improving the Lives of People with One of the Nation's Most Common Neurological Conditions. 2009. Recuperado el 29 de Enero de 2014 de la fuente: [http://www.cdc.gov/chronicdisease/resources/publications/aag/pdf/2011/epilepsy\\_aag\\_2011\\_508.pdf](http://www.cdc.gov/chronicdisease/resources/publications/aag/pdf/2011/epilepsy_aag_2011_508.pdf)

31.- Chakrakodi SS, Aboobakar AS and Badavanahalli JA. *Indian J Pharmacol*. 2013; 45(2): 121–125.

32.- Chapman JM, Cocolas, GH and Hall, IH. Hypolipidemic activity of phthalimide derivatives. 1. Nsubstituted phthalimide derivatives. *J. Med. Chem*. 1979, 22, 1399-1402.

33.- Chapman JM, Cocolas GH. and Hall IH. Hypolipidemic activity of phthalimide derivatives. IV: Further chemical modification and investigation of the hypolipidemic activity of N-substituted imides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1983, 72, 1344-1347.

34.- Chapman JM, Wyrick SD, Voorstad PJ, Maguire GH, Cocolas, GH and Hall IH. Hypolipidemic activity of phthalimide derivatives. V: Reduced and hydrolytic products of simple cyclic amides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1984, 73, 1482-1484.

35.- Chavez Cortes E. Hepatotoxicidad por farmacos. *Revista biomedica revisada por pares*. 2006, 6(11):e1977.

36.- Chen CY. A novel integrated framework and improved methodology of computer-aided drug design. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(9):965-88.

- 37.- Chilo Nuñez, H. El citocromo P450 y su Roll en la hepatotoxicidad inducida por las drogas. *Enfermedades del Aparato Digestivo*. 1999, 2(2), 34-37.
- 38.- Chimeti F. and Vomero S. *Farmaco [Sci]*, 30, 884. *Chem. Abstract*. 1976, 84, 43756c.
- 39.- Choi KH, Song C, Cheong C, Rhim H. Pharmacological studies of Cav3.1 T-type calcium channels using automated patch-clamp techniques. *Gen. Physiol. Biophys.* 2011, 30, 100–105.
- 40.- Choi SH, Choi DH, Lee JJ, Park MS, Chun BG. Imidazoline Drugs Stabilize Lysosomes and Inhibit Oxidative Cytotoxicity In Astrocytes. *Free Radical Biology & Medicine*. 2002. Vol. 32, No. 5, pp. 394-405.
- 41.- Chung SS. *Ther Adv Neurol Disord*. 2010; 3(2): 77–83.
- 42.- Cignarella G. and Sanna PJ. *Med. Chem.* 1981, 24, 1003.
- 43.- Clénet F, Hascoet M, Fillion G. Anxiolytic profile of HG1, a 5-HT-moduline antagonist in three models of anxiety. *European Neuropsychopharmacology* 2004, 14:449-456.
- 44.- Coenen AM, Drinkenburg WH, Inoue M. Genetic Models Absence Epilepsy, With Emphases on the WAG/Rij Strain of Rats. *Epilepsy Res*. 1992, 12:75-86.
- 45.- Comission on classification and Terminology on the International League Against Epilepsy: Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia* 1989, 30: 389-399.
- 46.- Comisión on Classification and Terminology on the International League Against Epilepsy. Propuesta de la ILAE de Terminología Revisada para la Organización de Crisis y Epilepsias 2010. Recuperado el 29 de Enero de 2014 de: <http://www.ilae.org/Visitors/Centre/ctf/documents/SpanishTranslationILAEHandout.pdf>.

- 47.- Conn PN. Principios de Farmacología. Hardman JG, Limbird LE. Goodman&Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Mc Graw-Hill. 10ª. Edición. México, D.F. 2003.
- 48.- Costanzi S. Modeling G protein-coupled receptors and their interactions with ligands. *Current Opinion in Structural Biology*. 2013; 23, 2. 185–190
- 49.- Contreras J, Poniachik J, Planzer M. Daño hepático por fármacos: características clínicas e histológicas en 33 casos. *Rev Med Chile*. 131:1128-1134. 2003.
- 50.- Correa-Basurto J, Ramos-Morales FR, Matus MH, Rosales-Hernández MC, Mancilla-Percino T, Trujillo-Ferrara J and Ilizaliturri-Flores I. Docking and DFT Studies to explore the Topoisomerase II ATP Pocket employing 3-Substituted 2,6-Piperazindiones for drug design. *Molecular Simulation*. 2012;38, 13, 1072-1084.
- 51.- Correa-Basurto J, Trujillo-Ferrara J, Rosales-Hernández M. Ligandos y Receptores en la Farmacología y Bioquímica desde un Punto de Vista Computacional. REIVMA 1. Sección de Estudios de Posgrado e Investigación y Departamento de Bioquímica, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional. 2006.
- 52.- Correa-Basurto J, Flores-Sandoval C, Rojo-Domínguez A, Trujillo-Ferrara J. Docking and quantum mechanics studies on cholinesterases and their inhibitors. *Eur. J. Med. Chem*. Oct 18 2006. Jan;42(1):10-9
- 53.- Cossio FP, Arrieta A, Lecea B. Aplicación a la Química Computacional Resolución de Problemas Químicos. España. 2003, 215-218.
- 54.- Cossio FP, Arrieta A. Aplicación de la Química Computacional Resolución de Problemas Químicos. 2003, España; 215-218.
- 55.- Cuevas G, Cortés F. Introducción a la Química Computacional. México. Fondo de Cultura Económica. 2003,15-27.



- 56.- de Biase S, Gigli GL, Valente M, Merlino G. Lacosamide for the treatment of epilepsy. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014, Mar;10(3):459-68.
- 57.- Dharam PJ. Synthesis of 4-(oxo-isodioline) and 4-(5,6-dimethoxy-1-oxo-isodioline)-substituted phenoxypropanolamines and their  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2-adrenergic receptor binding studies. *Bioorganic Chemistry*. 2005, 33 310-324.
- 58.- Dichter MA. Overview: The Neurobiology of epilepsy. *Epilepsy: A comprehensive Textbook*. Engel, j. & Pedley T. A. (Eds) Lippincott-Raven Publisher. Philadelphia. 1997, pp. 233-235.
- 59.- Ding JJ, Zhang YJ, Jiao Z, Wang Y. The effect of poor compliance on the pharmacokinetics of carbamazepine and its epoxide metabolite using Monte Carlo simulation. *Acta Pharmacol Sin*. 2012;33(11):1431-40.
- 60.- Dufour R. Guías del laboratorio para screening, diagnóstico y monitoreo de la lesión hepática. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2005, 39 (3): 359-76.
- 61.- Dumortier G, Cabaret W, Stamatidis L, Saba G, Benadhira R, Rocamora JF, Aubriot-Delmas B, Glikman J, Januel D. Hepatic tolerance of atypical antipsychotic drugs. *Encephale*. 2002 Nov-Dec;28(6 Pt 1):542-51.
- 62.- Drotman RB., Lawhorn GT. Serum enzymes as indicators of chemical induced liver damage. *Drug Chem. Toxicol*. 1978, 1: 163-171.
- 63.- Engel J. Seizures and epilepsy. Davids Company, U.S.A. 1989, pp. 3-7, 71-84.
- 64.- Fallon JL, Baker MR, Xiong L, Loy RE, Yang G, Dirksen RT, Hamilton SL, Quioco FA. Crystal structure of dimeric cardiac L-type calcium channel regulatory domains bridged by  $\text{Ca}^{2+}$  calmodulins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(13):5135-40.
- 65.- FDA, Food and Drug Administration [Web site]. Carbamazepine Official FDA information, side effects and uses. [Revised, 04/2013, Consultado 04/2014], disponible en: <http://www.drugs.com/pro/carbamazepine.html>

- 66.- Fernández VL. Influencia de los factores genéticos en la hepatotoxicidad secundaria a Fármacos antituberculosos. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela. Tesis Doctoral. 2008
- 67.- Flynn JT, Pasko DA. Calcium channel blockers: pharmacology and place in therapy of pediatric hypertension. *Pediatr Nephrol*. 2000 15:302–316
- 68.- Fontana RJ. Pathogenesis of Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury and Clinical Perspectives. *Gastroenterology*. 2014 Apr;146(4):914-928.
- 69.- Forster MJ. Molecular modeling in structural biology. *Micron*. 2002; 33: 365-384.
- 70.- Fraser A. Interpretation of liver enzyme tests – A rapid guide. 2007; 34,3, 194-196.
- 71.- Fredriksson L, Wink S, Herpers B, Benedetti G, Hadi M, de Bont H, Groothuis G, Luijten M, Danen E, de Graauw M, Meerman J, van de Water B. Drug-Induced Endoplasmic Reticulum and Oxidative Stress Responses Independently Sensitize Towards TNF $\alpha$ -Mediated Hepatotoxicity. *Toxicol Sci*. 2014 Apr 20. [Epub ahead of print]
- 72.- Gaby AR. Natural Aproches to Epilepsy. *Alternative Medicine Review*. 2007, Volume 12, Number 1:9-24.
- 73.- Gates R. Drug Metabolism. *Biofiles SIGMA-ALDRICH*. 2010; 6;1;3-22
- 74.- Gatti G, Fattore C. Is there a rationale for politherapy in epilepsy? Molecular and cellular targets for anti-epileptic drugs. Avazini, G. (Eds) Jhon Libbey & Company Ltd., p 243. 1997.
- 75.- Glauser T, Ben-Menachem E, Bourgeois B, Cnaan A, Chadwick D, Guerreiro C, Kalviainen R, Mattson R, Perucca E, and Tomson T. ILAE Treatment Guidelines: Evidence-based Analysis of Antiepileptic Drug Efficacy and Effectiveness as Initial Monotherapy for Epileptic Seizures and Syndromes. *Epilepsia*, 2006;47(7):1094–1120.

- 76.- Gómez-Alonso J, Bellas-Lamas P. Nueva clasificación de las epilepsias de la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE): ¿un paso en dirección equivocada? Rev Neurol 2011; 52 (9): 541-547.
- 77.- Gonzalez FJ and Tukey RH. Drug Metabolism Chapter 3. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition McGraw Hill Professional. 2010. 71-91.
- 78.- Gordon D, Chen R and Chung SH. Physiol Rev. 2013; 93(2): 767–802.
- 79.- Grau ES, Gallardo Díaz E y Martínez Peralta S. Fármacos antiepilépticos en situaciones especiales. SERVICIO DE ONCOLOGÍA MÉDICA HOSPITAL DE SABADELL. INSTITUTO UNIVERSITARIO PARC TAULÍ. SABADELL. 129-140. 2013.
- 80.- Guerrini R, Zaccara C, la Marca G and Rosati A. Safety and Tolerability of Antiepileptic Drug Treatment in Children with Epilepsy. Drug Saf. 2012; 35(7):519-533.
- 81.- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996). Institute for Laboratory Animal Research (ILAR). [http://books.nap.edu/openbook.php?record\\_id=5140&page=21](http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=5140&page=21)
- 82.- Gutiérrez GY, Chávez CN, Méndez Sánchez N, Kobashi R. Hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica: conceptos actuales. Revista de gastroenterología de México. 2010, 1-6.
- 83.- Hales RE. Fundamentos de Psiquiatría Clínica. Elsevier España, 2006.
- 84.- Hall IH, Voorstad PJ, Chapman JM and Cocolas GH. Antihyperlipidemic activity of phthalimide analogues in rodents. Journal of Pharmaceutical Sciences. 1983, 72, 845-851.
- 85.- Harper HA. The functions and tests of the liver, In: Review of physiological chemistry. Lange Medical Publishers. 1961: 271-283.

- 86.- Hashimoto Y. Structural development of biological response modifiers based on thalidomide. *Bioorg. Med. Chem.* 2002, 10, 461-479.
- 87.- Higuchi S, Yano A, Takai S, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, Yokoi T. Metabolic activation and inflammation reactions involved in carbamazepine-induced liver injury. *Toxicol Sci.* 2012;130(1):4-16.
- 88.- Horňák V, Dvorský R and Šturdík E. Receptor-Ligand Interaction and Molecular Modelling. *Gen Physiol Biophys.* 1999, 18, 231—248 23.
- 89.- Howanitz JH, Howanitz PJ. *Laboratory Medicine.* 1<sup>st</sup> ed. New York: Livingstone Churchill Inc; 1991.p.67-84.
- 90.- Hussaini SH, Farrington EA. Idiosyncratic drug-induced liver injury: an update on the 2007 overview. *Expert Opin Drug Saf.* 2014 Jan;13(1):67-81.
- 91.- Jelena Z, Nevena T, Nada T, Maja B, Snežana D, Tamara LP, Bernardi RE, Aleksandra D, Dragana F. Chronic administration of fluoxetine or clozapine induces oxidative stress in rat liver: A histopathological study. *Eur J Pharm Sci.* 2014 Apr 21. pii: S0928-0987(14)00162-6. doi: 10.1016/j.ejps.2014.04.010. [Epub ahead of print]
- 92.- Jensen-Seaman MI, Furey TS, Payseur BA, Lu Y, Roskin KM, Chen C, Thomas MA, Haussler D and Jacob HJ. Comparative Recombination Rates in the Rat, mouse, and Human Genomes. *Genome Research.* 2004, 14:528-538.
- 93.- Jiang Y, Andrews SW, Condroski KR, Buckman B, Serebryany V, Wenglow sky S, Kennedy AL, Madduru MR, Wang B, Lyon M, Doherty GA, Woodard BT, Lemieux C, Geck Do M, Zhang H, Ballard J, Vigers G, Brandhuber BJ, Stengel P, Josey JA, Beigelman L, Blatt L, Seiwert SD. Discovery of danoprevir (ITMN-191/R7227), a highly selective and potent inhibitor of hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease. *J Med Chem.* 2014 Mar 13;57(5):1753-69.

- 94.- Johannessen LC, Johannessen SI, Tomson, T. Host factors affecting antiepileptic drug delivery-Pharmacokinetic variability. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012, Jul;64(10):896-910.
- 95.- Kálai T, Kuppusamy ML, Balog M, Selvendiran K, Rivera BK, Kuppusamy P and Hideg K. Synthesis of N-Substituted 3,5-Bis(arylidene)-4-piperidones with High Antitumor and Antioxidant Activity. *J. Med. Chem.* 2011, 54, 5414–5421.
- 96.- Kalapos MP. Carbamazepine-provoked hepatotoxicity and possible aetiopathological role of glutathione in the events. Retrospective review of old data and call for new investigation. *Adverse Drug React Toxicol Rev.* 2002;21(3):123-41.
- 97.- Keränen T, Sivenius J. Side effects of carbamazepine, valproate and clonazepam during long-term treatment of epilepsy. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1983, 97:69-80.
- 98.- Kumar SS, Babu IS, Chiidambarnathan N. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of some synthesized 2-[(1-((phenhylamino) methyl) substituted 1-benzimidazol-2-yl) alkyl isoindoline-1,3-diones. *Journal of Applied Bioscience* 2013;39(2), 85-92
- 99.- Lackman GM. Valproic acid-induced thrombocytopenia and hepatotoxicity: discontinuation of treatment. *Pharmacology.* 2004, 70(2): 57-8.
- 100.- Leach AR. Molecular modeling. Principles and applications. Addison Wesley-Logman Ltd. Essex, Inglaterra. 1996, pp. 543-585.
- 101.- Leise MD, Poterucha JJ, Talwalkar JA. Drug-induced liver injury. *Mayo Clin Proc.* 2014 Jan;89(1):95-106
- 102.- Leppik LE, Hovinga CA. Extended-release antiepileptic drugs: A comparison of pharmacokinetic parameters relative to original immediate-release formulations. *Epilepsia.* 2013, volume 54, Issue 1, pages 28–35.
- 103.- Levy RH. Antiepileptic Drugs. Lippincott Williams & Wilkins, 2002; 225-285.

- 104.- Lewan L, Andersson M, Morales-Gomez P. The Use of Artemia Salina in Toxicity Testing. Ninth Scandinavian Cell Toxicity Congress. 1992. ATLA 20, 297-301.
- 105.- Lheureux PE, Hantson P. Carnitine in the treatment of valproic acid-induced toxicity. Clin Toxicol (Phila). 2009, 47(2): 101-111.
- 106.- Lipkind MG and Fozzard HA. Biochemistry. 2001, 40, 6786-6794.
- 107.- Leone A, Nie A, Brandon Parker J, Sawant S, Piechta LA, Kelley MF, Mark Kao L, Jim Proctor S, Verheyen G, Johnson MD, Lord PG, McMillian MK. Oxidative stress/reactive metabolite gene expression signature in rat liver detects idiosyncratic hepatotoxicants. Toxicol Appl Pharmacol. 2014 Mar 15;275(3):189-97. doi: 10.1016/j.taap.2014.01.017. Epub 2014 Jan 29.
- 108.- Löscher W, Hönack D. Intravenous carbamazepine: comparison of different parental formulations in a mouse model of convulsive status epilepticus. Epilepsia. 1997, 38(1):106-113.
- 109.- Löscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptic and disease-modifying. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res. 2002, 50, 105-123.
- 110.- Maheswari E, Saraswathy GR, Santhranii T. Hepatoprotective and antioxidant activity of N-acetyl cysteine in carbamazepine-administered rats. Indian J Pharmacol. 2014 Mar;(2):211-5. doi: 10.4103/0253-7613.129321.
- 111.- Macdonald RL, Kelly KM. Antiepileptic drug mechanisms of action. Epilepsia. 1995; 36: S2-12.
- 112.- MacDougall C, Chambers HF. Chapter 55 Protein Synthesis Inhibitors and Miscellaneous Antibacterial Agents. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann, eds Goodman & Gilman's The Pharmacologic Basis of Therapeutics (12 ed.). New York: McGraw-Hill 2011.

- 113.- Mancilla-Percino T. Synthesis and characterization of new 2-substituted isoindoline derivatives of  $\alpha$ -amino acids. *Organic Preparations and Procedures Int.* 2001, 33(4), 395-418.
- 114.- Mancilla-Percino T, Correa-Basurto J, Trujillo-Ferrara J, Ramos-Morales FR, Acosta-Hernández ME, Cruz-Sánchez JS, Saavedra-Vélez M. Molecular modeling study of isoindolines as L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers by docking calculations. *J Mol Model.* 2010, 16:1377–1382
- 115.- Martignoni M, Groothuis MM, De Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006;2(6); 885-894.
- 116.- Marwick KF, Taylor M, Walker SW. Antipsychotics and abnormal liver function tests: systematic review. *Clin Neuropharmacol.* 2012 Sep-Oct;35(5):244-53.
- 117.- Matalka KZ, Alfarhoud F, Qinna NA, Mallah EM, Abu-Dayyih WA, Muhi-eldein ZA. Anti-inflammatory aminoacetylenic isoindoline-1,3-dione derivatives modulate cytokines production from different spleen cell populations. *Int Immunopharmacol.* 2012 Nov;14(3):296-301.
- 118.- Medina-Malo C. Historia de las Epilepsias. *Epilepsias: Diagnóstico y tratamiento.* Campos, M. G. (Eds) Editorial Mediterráneo Ltda., Santiago, Chile. 1948, Pp. 37-48.
- 119.- Mohammadi-Farani A, Ahmadi A, Nadri H, Aliabadi A. Synthesis, docking and acetylcholinesterase inhibitory assessment of 2-(2-(4-Benzylpiperazin-1-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione derivatives with potential anti-Alzheimer effects. *Daru.* 2013; 7;21(1):47.
- 120.- Mody I. The molecular basis of kindling. *Brain Pathology.* 1983, 3, 395-403.
- 121.- Moitessier N, Englebienne P. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *British Journal of Pharmacology.* 2008,153, S7- S26.

- 122.- Moreira F y Lopez San Roman A. Colestasis crónicas. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 2006, 98(1).
- 123.- Niu X, de Graaf IA, Langelaar-Makkinje M, Horvatovich P, Groothuis GM. Diclofenac toxicity in human intestine ex vivo is not related to the formation of intestinal metabolites. *Arch Toxicol*. 2014 Apr 26. [Epub ahead of print]
- 124.- Obay BD, Tasdemir E, Tümer C. Antiepileptic effects of ghrelin on pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *Peptides*. 2007 Jun; 28(6):1214-1219.
- 125.- Olsen RW. GABA and epileptogenesis. *Epilepsia*, 1997, 38, 399-407.
- 126.- Opie LH. Pharmacological differences between calcium antagonists. *European Heart Journal*. 1997. 18 (Supplement A) A71-A79.
- 127.- Ortiz HN, Giacopini MI, Alfonso P. Efecto antioxidante del tomate (*Lycopersicon Esculentum* Mill) en la lipoproteína de alta densidad (HDL) y en los microsomas hepático de la rata. *AVFT*. 2003, 22; 1:46-52.
- 128.- Padilla J. Simulación del Reconocimiento entre Proteínas y Moléculas orgánicas o Docking. Aplicación al Diseño de Fármacos. *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXVI. Depto. De Bioquímica de la Universidad Nacional Autónoma de México. <http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>. 2002
- 129.- Pagana DK, Pagana JT. Guía de pruebas diagnósticas y de laboratorio. 5ª Ed. Williamsport, Pennsylvania: Harcourt; 2003.
- 130.- Patel M, Pawar S. Effect of combination fo Ziprasidone with Carbamazepine on liver of Wistar albino rats. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2012. 3(2), 695-702
- 131.- Pavlova T, Stepanichev M, Gulyaeva N. Pentylenetetrazole kindling induces neuronal cyclin B1 expression in rat hippocampus. *Neuroscience Letters*. 2006, 392:154-158.
- 132.- Pavlova TV, Yakovlev A. A., Stepanichev M. Yu., and Gulyaeva N. V. Pentylenetetrazol Kindling in Rats: Is Neurodegeneration Associated with



Manifestations of Convulsive Activity? Neuroscience and Behavioral Physiology. 2006, Vol. 36, No. 7.

133.- Peeters BWMM, Spooren WPJM. The WAG/Rij Rat Model For Absence Epilepsy: Anticonvulsant Drug Evaluation. *Neurosci Res Commun*. 1998, 293-297.

134.- Pellock JM. Carbamazepine side effects in children and adults. *Epilepsia*. 1987, 28 Suppl 3:S64-70.

135.- Penner N, Woodward C and Prakash Ch. DRUG METABOLIZING ENZYMES AND BIOTRANSFORMATION REACTIONS. *ADME-Enabling Technologies in Drug Design and Development*, First Edition. Edited by Donglu Zhang and Sekhar Surapaneni. © 2012 John Wiley & Sons, Inc. Published 2012 by John Wiley & Sons, Inc. 545- 565.

136.- Piana C, Antunes ND, Della Pasqua O. Implications of pharmacogenetics for the therapeutic use of antiepileptic drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014 Mar;10(3):341-58.

137.- Planjar-Prvan M, Bielen A, Sruk A, Marusić M, Bielen I. Acute oxcarbazepine-induced hepatotoxicity in a patient susceptible to developing drug-induced liver injury. *Coll Antropol*. 2013;37(1):281-4.

138.- Porter RJ. How to initiate and maintain carbamazepine therapy in children and adults. *Epilepsia*. 1987, 28 Suppl 3:S59-63.

139.- Puranik YG, Birnbaum AK, Marino SE, Ahmed G, Cloyd JC, Remmel RP, Leppik IE, Lamba JK. Association of carbamazepine major metabolism and transport pathway gene polymorphisms and pharmacokinetics in patients with epilepsy. *Pharmacogenomics*. 2013 Jan;14(1):35-45.

140.- Qinna NA, Muhi-Eldeen ZA, Ghattas M, Alhussainy TM, Al-Qaisi J, Matalaka KZ. Non-selective inhibition of cyclooxygenase enzymes by aminoacetylenic isoindoline 1,3-diones. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012;11(5):369-74.

- 141.- Ramos-Morales FR, Correa-Basurto J, Saavedra-Vélez MV, Acosta-Hernández ME, Gasca-Pérez E, Pérez-Palacios A, Trujillo-Ferrara J. Modelo PTZ: un *screening* primario para el desarrollo de nuevas moléculas con actividad anticonvulsivante Arch Neurocién (Mex). 2012; Vol. 17, No. 1: 45-48.
- 142.- Redhu S, Jindal A. Molecular Modelling: A New Scaffold For Drug Design. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2013, Vol 5, Suppl 1, 5-8.
- 143.- Remmel RP, Sinz MW. Dose-Dependent Pharmacokinetics of Carbamazepine in Rats: Determination of the Formation Clearance of Carbamazepine-10, 11-epoxide. Pharmaceutical Research. 1990, vol 7, number 5. pp. 513-517.
- 144.- Roberts C; Harvey MT, May ME, Valdovinos MG, Patterson TG. Varied Effects of convetional antiepileptics on responding maintained by negative versus positive reinforcement. Physiol. Behav. 2008, 27; 93(3): 612-21.
- 145.- Rodríguez M, Bautista Montagud J, Roberto J, Mayol, MJ. Hepatitis granulomatosa idiopática con orquiepididimitis bilateral y erupcion cutanea. Revista Medica de Chile. 2002, 130(11).
- 146.- Rodríguez C, Guevara B, Lobo G. Mecanismo de Acción de los Fármacos Antiepilépticos. Informe Médico. 2010; 12(6):321-326.
- 147.- Rubio-Donnadieu F. Aspectos generals y clasificación de la epilepsia. Epilepsia, Aspectos neurobiológicos, médicos y sociales. Feria, V. A., Rubio-Donnadieu, F. (Eds). Instituto de Neurología y Neurocirugía. 1997, pp. 1-24.
- 148.- Rubio-Donnadieu F. Perfil de la epilepsia en México. Primer Congreso Latinoamericano de Epilepsia. Santiago de Chile. 2000.
- 149.- Rubio-Donnadieu F. Reséndiz-Aparicio J.C. Lineamientos para el tratamiento de la epilepsia. Programa Prioritario de epilepsia. México. 2001.

- 150.- Rubio F, Reséndiz JC. Senties H, Alonso MA Salgado P, Ramos J. Epilepsia. Programa Prioritário de Epilepsia. 2007 Primera Edición.
- 151.- Sanna, P, Cignarella G, Anania V, Siri, R and Desole MS. Farmaco [Sci]. 1985, 40, 777.
- 152.- Sarisjulis N, Gamboni B, Plouin P. Diagnosing idiopathic/cryptogenic epilepsy syndromes in infancy. Arch. Child. 2000, 226;82 pp. 226-230.
- 153.- Savic I. Sex differences in human epilepsy. Exp Neurol. 2014 Apr 16. pii: S0014-4886(14)00111-3. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.04.009. [Epub ahead of print]
- 154.- Scheuerman O, Racheiml A. Successful Treatment of Antiepileptic Drug Hypersensitivity With Intravenous Immune Globulin. Pediatrics. 2001, 107; e 14.
- 155.- Schlicker E, Fink K, Kathmann M, Molderings GJ, Gothert M. Effects of imidazolines on noradrenaline release in brain: an investigation into their relationship to imidazoline, alpha 2 and H3 receptors. Neurochem. Int. 1997, Jan; 30(1): 73-83.
- 156.- Sedky K, Racha N, Joshi A. Which psychotropic medications induce hepatotoxicity? General Hospytal Psichiatty. 2012, 34 (1): 53-61.
- 157.- Sell Salazar F. Epilepsia en la niñez (2 ed.). Costa Rica: Hipertexto Ltda. 2003
- 158.- Shakir R, Muhi-Eldeen ZA, Matalka KZ, Qinna NA. Analgesic and Toxicity Studies of Aminoacetylenic Isoindoline-1,3-dione Derivates. ISRN Pharmacol. 2012;2012:657472
- 159.- Shen C, Meng Q, Schmelzer E, Bader A. Gel entrapment culture of rat hepatocytes for investigation of tetracycline-induced toxicity. Toxicol Appl Pharmacol. 2009. Jul 15;238(2):178-87.

160.- Servillo A. America Lab Servillo S.A. Disponible en: <http://www.americallab.net/laboratorio/pruebas-de-funcion-hepatica-.html>. Recuperado el 20 de julio de 2013.

161.- Shi L, Dang XL, Liu XY, Wei HM, Yang MM, Zhang Y. Effect of *Sophora flavescens* on the pharmacokinetics of carbamazepine in rats. *Arch Pharm Res*. 2014 Apr 2. [Epub ahead of print]

162.- Shorvon SD and Sander JW. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1996 November; 61(5): 433–443.

163.- Shultz M, Fan J, Chen C, Cho YS, Davis N, Bickford S, Buteau K, *et al*. The design, synthesis and structure–activity relationships of novel isoindoline-based histone deacetylase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011, 21 4909–4912.

164.- Sliwoski G, Kothiwale S, Meiler J, Lowe EW Jr. Computational methods in drug discovery. *Pharmacol Rev*. 2013; 66(1):334-95.

165.- Stafstrom CE. Mechanisms of action of antiepileptic drugs: the search for synergy. *Curr Opin Neurol*. 2010; 23:157–163.

166.- Stavvraikov G, Valcheva V, Dobrikov G. Antimycobacterial activity of novel based isoindoline. *Pharmacia*. 2013; 60(3), 13-16.

167.- Stockis A, Sargentini-Maier ML, Horsmans Y. Brivaracetam disposition in mild to severe hepatic impairment. *J Clin Pharmacol*. 2013;53(6):633-41.

168.- Suarez JH. Antiepileptic and cognitive changes in epilepsy. *Acta neurologica colombiana*. 2007;(23):31-31.

169.- Svendsen P, Hau J. *Handbook of laboratory animal science* 4<sup>th</sup> ed. Boca Raton (Florida): CRC Press, Inc; 2000 vol. 1

170.- Taylor P, Blackburn E. Ligand discovery and virtual screening using the program LIDAEUS. *British Journal of Pharmacology*. 2008, 153, S55-S67.

171.- Tejada Cifuentes F. Hepatotoxicidad por Fármacos. Revista Clínica de Medicina de Familia. 2010,3(3).

172.- Thapa BR and Walia A. Liver Function Tests and their Interpretation. Indian Journal of Pediatrics. 2007; 74, 663.671.

173.- Trejo Muñoz, Jiménez EM, Pinto-Almazán R, Díaz Gandarilla JA, Correa-Basurto J, Trujillo-Ferrara JG, Guerra-Araiza C, Talamás Rohana P, Mancilla Percino T. Effect of two series of isoindolines over HDAC8 activity and expression. Med Chem Res (2014) 23:3227–3234

174.- Trejo Muñoz CR, Mancilla Percino T, Jiménez E, Correa-Basurto J, Trujillo Ferrara JG. Partition coefficient determination of a series of isoindolines-2-substituted and its correlation with their antiproliferative activity on HeLa cells. Med Chem Res (2013) 22:4039–4045

175.- Tso SC, Qi X, Gui WJ, Wu CY, Chuang JL, Wernstedt-Asterholm I, Morlock LK, Owens KR, Scherer PE, Williams NS, Tambar UK, Wynn RM, Chuang DT. Structure-guided development of specific pyruvate dehydrogenase kinase inhibitors targeting the ATP-binding pocket. J Biol Chem. 2014 Feb 14;289(7):4432-43. doi: 10.1074/jbc.M113.533885. Epub 2013 Dec 19.

176.- Uldall P, Alving J, Hansen LK. The misdiagnosis of epilepsy in children admitted to a tertiary epilepsy centre with paroxysmal events. Arch. Dis. Child. 2006; 91: pp. 219-221.

177.- Vakser IA. Curr Opin Struct Biol. 2013;23(2): 198–205.

178.- Valsecia M, Malgor L. Drogas anticonvulsivantes o antiepilepticas. Farmacología Médica. Catedra de Farmacología. Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste. 1999. 37-58

178.- Van Goethem S, Van der Veken P, Dubois V, Soroka A, Lambeir AM, Chen X, Haemers A, Scharpé S, De Meester I, Augustyns K. Inhibitors of dipeptidyl

peptidase 8 and dipeptidyl peptidase 9. Part 2: isoindoline containing inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008,18(14):4159-62.

179.- Van Petegem F, Minor DL. The structural biology of voltage-gated calcium channel function and regulation. *Biochem Soc Trans*. 2006, 34;887-893.

180.- Wah Sam T. Toxicity Testing Using The Brine Shrimp: *Artemia salina*. *Bioactive Natural Products*. Chapter 18. CRC Press. Inc. 1993, pp 442-454.

181.- Wang S, Li Y, Xu L, Li D, Hou T. Recent developments in computational prediction of HERG blockage. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(11):1317-26.

182.- Weir-Torn Jiaang. Novel isoindolines compounds for potent and selective inhibition of prolyl dipeptidase DPP8. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2005, 15 687-691.

183.- Xu D, Miller SD, Koh S. Immune mechanisms in epileptogenesis. *Frontier in Cellular Neuroscience*. 2013;(7):1-8.

184.- Xu Z, Shen Y, Beier RC, Yang J, Lei H, Wang H, Sun Y. Application of computer-assisted molecular modeling for immunoassay of low molecular weight food contaminants: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2009, 647:125–136

185.- Xu C, Li CY, Kong AN. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res*. 2005 Mar;28(3):249-68.

186.- Zafer M, Onat F. Ethosuximide: From Bench to Bedside. *CNS Drugs Reviews*. 2007, 13.2, pp. 224-239.

187.- Zanger UM, Turpein M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem*. 2008 Nov;392(6):1093-108.

188.- Zhao C, Wu W. Application of 3-n-isoindoline-1-one to preparing drug for preventing and treating cerebral infraction. *PCT Int Appl*. 2014. 2014040524 A1 20140320

189.- Zhang W, Lou H, Zhou M, Lu L, Wu F, Li R. Design, synthesis and evaluation of antiproliferative activity of isoindoline-1,3-dione derivatives as novel P13K inhibitors. *Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi*. 2013 23(3), 181-186.

190.- Zimmerman HJ, Ishak KG. General aspects of drug induced liver disease. *Gastroenteron Clin Norht Am*. 1995, 248; 24: 739-57.





## **Apendice I**

### **Química Computacional**

A fines de los años 70's apareció un nuevo campo de conocimiento orientado al diseño de moléculas asistido por computadora, llamado química computacional. Esta nueva disciplina fue impulsada por las principales compañías farmacéuticas (**Silwoski, 2013; Cuevas, 2003**).

La química computacional es el estudio de los procesos químicos mediante diversas herramientas de cómputo. Utiliza los resultados de la química teórica (algoritmos matemáticos, estadísticos, así como, leyes fundamentales de la física para el desarrollo de modelos de descripción en cualquier sistema químico), incorporados a un programa, para calcular las estructuras y las propiedades físico-químico-estructurales de las moléculas. Este subcampo se apoya en el modelado molecular que permite simular la interacción inter-molecular basado en métodos mecánicos cuánticos, así como, para representar a las moléculas en 3 dimensiones de manera que puedan determinarse sus propiedades y entender o apreciar el comportamiento observado experimentalmente (**Redhu, 2013; Silwoski, 2013; Xu, 2009; Cossio, 2003; Forster, 2002**).

### **Modelado Molecular**

El modelado molecular es una disciplina que tuvo sus inicios a partir de la mitad del siglo XIX (**Silwoski, 2013; Casanovas, 2005**). Hoy en día es una de las disciplinas más ampliamente explotadas debido a que permite crear modelos químicos de diversos materiales, a nivel molecular o atómico, mediante la resolución de la ecuación Schödinger que describe el comportamiento de los núcleos y electrones del sistema (**Redhu, 2013; Casanovas, 2003**). El modelado molecular consiste en caracterizar y predecir la estructura y estabilidad de un sistema químico, estimar las diferencias energéticas entre los distintos estados conformacionales, explicar mecanismos y procesos químicos generales a nivel

atómico y molecular (**Redhu, 2013; Silwoski, 2013; Xu, 2009; Casanovas, 2003; Montero, 2003**). Los procesos de la manipulación de la geometría molecular permiten estudiar las diferentes conformaciones de un sistema y al acoplarse con los métodos de cálculo, permite el estudio de las propiedades moleculares dependientes de la conformación. Esta disciplina engloba métodos teóricos y técnicas computacionales para modelar o imitar el comportamiento de las moléculas, y mediante el uso de gráficas representan la estructura y comportamiento de la misma (**Redhu, 2013; Casanovas, 2003; Montero, 2003**).

Anteriormente muchos medicamentos debían su descubrimiento al estudio de los remedios naturales tradicionales, como el aislamiento de principios activos a partir de los mismos (**Leach, 1996**). Actualmente, el diseño de moléculas asistido por computadora, ha aplicado con éxito en muchos campos de la biología, ciencias farmacéuticas y de biotecnología, el uso de estas metodologías, ha permitido comprender la estructura molecular y la actividad biológica de innumerables sistemas (**Chen, 2013; Gordon, 2013; Wang, 2013; Silwoski, 2013; Xu, 2009**).

En la actualidad, el costo del proceso del descubrimiento y desarrollo de fármacos ha aumentado significativamente durante los últimos 35 años. El diseño de fármacos asistido por computadora es una herramienta que se emplea para aumentar la eficiencia del proceso de nuevas moléculas con actividad biológica (**Chen, 2013; Constanzi, 2013; Gordon, 2013; Sliwoski ,2013; Thakur ,2012**). Este proceso utiliza búsquedas sistemáticas con el propósito de encontrar moléculas con mayor efecto farmacológico y menor toxicidad, en menor tiempo y a muy bajo costo (**Chen, 2013; Sliwoski ,2013; Thakur ,2012; Padilla, 2002**). El modelado molecular ha traído consigo muchas herramientas que permiten explicar de una forma más sencilla y con bases químico-biológicas dichos mecanismos (**Correa-Basurto, 2012; Correa-Basurto, 2006**).

## **Acoplamiento molecular (*Docking*)**

Dentro de las herramientas virtuales más utilizadas, la técnica de acoplamiento molecular ha sido empleada para el descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas, esta técnica permite predecir los sitios de unión, la afinidad, así como, los receptores a dichas moléculas **(Gordon, 2013; Wang, 2013; Correa-Basurto 2012; Moitessier, 2008; Bottegoni, 2007; Forster, 2002)**.

El objetivo de esta metodología, consiste en encontrar la unión más estable entre el ligando (molécula que se une con una biomolécula para ejercer un efecto biológico) y el receptor (molécula de origen proteico que responde a ligandos endógenos específicos) con un menor requerimiento energético, así como, el sitio idóneo de interacción molecular, de tal manera que la energía libre del sistema general se minimiza **(Wang, 2013; Correa-Basurto, 2012; Moitessier, 2008; Bottegoni, 2007; Horňák 1999)**. Esta técnica ha sido de gran utilidad para explicar los fenómenos que gobiernan las interacciones ligando-receptor (L-R), ya que permite acomodar una molécula sobre otra tal y como ocurre entre los ligandos y receptores de cualquier organismo **(Chen, 2012; Correa-Basurto, 2012; Correa-Basurto, 2006; Forster, 2002; Harnak 1999)**.

Los métodos computacionales de acoplamiento molecular no sólo han demostrado ser útiles para identificar moléculas líder, sino que, además en los casos de alta afinidad molecular, han generado representaciones tridimensionales de la interacción ligando-proteína que resultan ser muy similares a las descripciones logradas experimentalmente por difracción de rayos X **(Chen, 2013; Vakser, 2013; Correa-Basurto, 2006; Padilla, 2002; Forster, 2002)**.

Cabe mencionar, que es necesario realizar nuevas simulaciones por computadora que permitan una mejor descripción del espacio de conformaciones del ligando. Esto implica ensayar mayor número de orientaciones rígidas y optimizar cada una de ellas, e incluso permitir una mayor movilidad a la molécula **(Chen, 2013; Correa-Basurto, 2012; Correa – Basurto, 2006)**.

Esta metodología requiere de tiempos de cálculo por molécula relativamente grandes pero accesibles, dado que se estudia un número mucho menor de compuestos respecto al de la primera etapa de simulación. La importancia de tener orientaciones confiables de los ligandos radica en que éstas permiten postular hipótesis sobre las características moleculares de la unión y la manera en que podrían modificarse las estructuras para aumentar su afinidad y/o selectividad (**Chen, 2013; Wang, 2013; Correa-Basurto 2012; Correa-Basurto, 2006**).

Se considera a esta técnica una herramienta computacional básica para el diseño de nuevas moléculas al proporcionar el detalle de la unión entre el ligando y el receptor a escala molecular y atómica. Es necesario recalcar que las simulaciones por computadora no sustituyen a los experimentos y pruebas físicas, sino que permiten plantear una aproximación complementaria del sujeto de estudio, al proporcionar el detalle de la unión proteína – ligando a escala molecular y atómica (**Xu, 2009; Correa – Basurto, 2006; Forster, 2002**).

## Apéndice II

### Estudio teórico computacional y evaluación de la actividad anticonvulsivante del (S)-2-(1,3-dihidroisoindol-2-il)-3-(1*H*-indol-3-il)propanoato de metilo

En un trabajo previo se realizó un estudio un estudio teórico computacional de dos series de isoindolinas 1(a-g) y 2(a-g) (Figura 1) como posibles bloqueadores del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, empleando como fármacos de referencia nifedipina y etosuccimida. De igual manera se evaluaron e identificaron los sitios de interacción, así como, la Energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) de nifedipina y etosuccimida, de los cuales se sabe que son fármacos bloqueadores de esta proteína. Los resultados obtenidos en el acoplamiento molecular muestran que todas las isoindolinas 1 y 2 (a-g), independientemente de su grupo funcional (éster o carboxilo) interactúan con el poro interno del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Además, los compuestos 1a y 1b interactúan en dominios similares que nifedipina, asimismo, nifedipina interactúa adicionalmente en el dominio IIS6, cabe señalar que, los valores de las energías de las isoindolinas son mayores comparadas con nifedipina y etosuccimida (Mancilla, 2010; Acosta-Hernández, 2009).

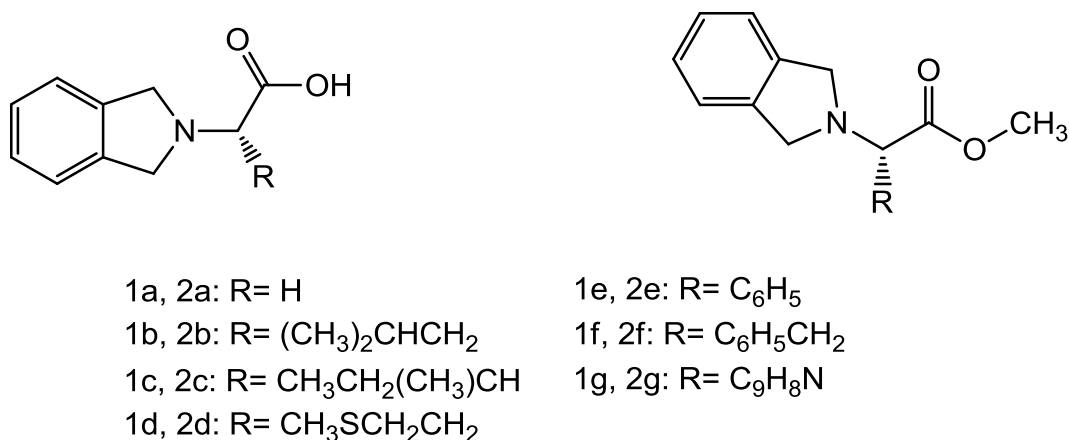


Figura 1. Series de isoindolinas 1(a-g) y 2(a-g).

La isoindolina 2a muestra, al igual que nifedipina, interacción con el dominio IIIS6, asimismo, este compuesto presenta interacción adicional con los dominios IIIS5, IIIP, IVS6, este compuesto posee más sitios de interacción con el poro interno del canal, lo cual podría explicar el valor de  $\Delta G$ . Para el caso de los compuestos 2b, 1c, 2c, 1d, 2d y 2g estos muestran sitios de interacción similares dentro del canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , además el compuesto 2g presenta interacción adicional con el dominio IVP. Asimismo los compuestos 1 y 2e comparten los mismos sitios de interacción dentro de la proteína, caso similar presentan los compuestos 1f y 1g al interaccionar en los mismos dominios dentro del canal, y para el caso del compuesto 2f, este compuesto no comparte ningún sitio de interacción con respecto a las demás isoindolinas (**Mancilla, 2010; Acosta-Hernández, 2009**).

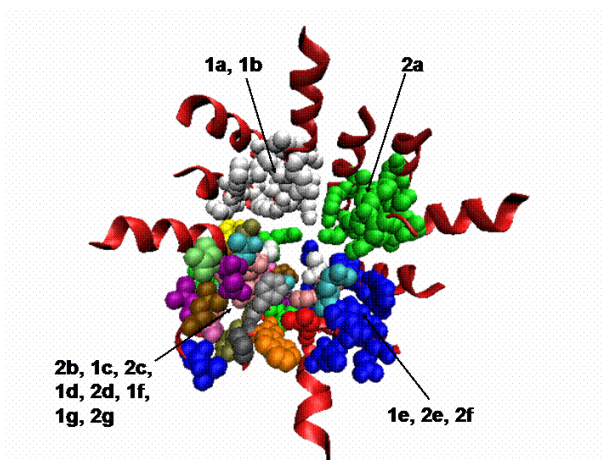
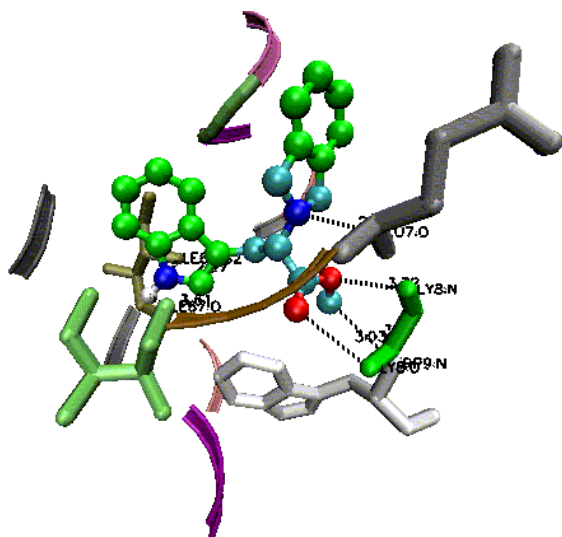


Figura 2. Complejo formado entre la proteína del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  con los compuestos 1a y 1b se muestran en blanco, el complejo formado por el compuesto 2a y la proteína se ilustra en verde. Asimismo, para los compuestos 2b, 1c, 2c, 1d, 2d, 1f, 1g y 2g con la proteína están marcados en diferentes colores, y en azul se muestran los complejos formados por los compuestos 1e, 2e y 2f con la proteína (**Mancilla-Percino, 2010; Acosta-Hernández, 2009**).



Interacciones:

HN con el C de Ile en la posición 176

NH con el O de Ile en la posición 1111

N con el O de Glut en la posición 1134

C=O con el O Gli de la posición 1143

CH<sub>3</sub>O con el N del Gli de la posición 1140

OCH<sub>3</sub> con el N del Trp en la posición 1144

Figura 3. Interacciones de los grupos funcionales de (S)-2-(1,3-dihidroisoindol-2-il)-3-(1*H*-indol-3-il)propanoato de metilo con el canal de Ca<sup>2+</sup> obtenido en el Acoplamiento molecular (**Acosta-Hernández, 2009**).

La Tabla 1 muestra los valores de  $\Delta G$  (kcal/mol) para cada uno de los complejos canal de Ca<sup>2+</sup> - isoindolinas obtenidas en el acoplamiento molecular, estas indican que los compuestos 1(a-g) y 2(a-g) interaccionan con el canal de Ca<sup>2+</sup>, lo cual sugiere que las isoindolinas-2-sustituidas podrían ejercer a nivel experimental un efecto biológico como bloqueadores de la proteína (**Mancilla, 2010, Acosta-Hernández, 2009**).

Tabla 1. Valores de  $\Delta G$  (kcal/mol) obtenidos en el modelado molecular para los diferentes derivados de isoindolina, etosuccimida y nifedipina

| Derivado       | R  | $\Delta G$ (kcal/mol) | Kd ( $\mu M$ ) |
|----------------|--|-----------------------|----------------|
| 1 <sup>a</sup> | H  | -8.55                 | 0.54           |
| 2 <sup>a</sup> | H  | -7.33                 | 4.28           |
| 1b             | (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -  | -10.38                | 0.0244         |
| 2b             | (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -  | -7.31                 | 4.32           |
| 1c             | CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> )CH | -8.15                 | 1.06           |
| 2c             | CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> )CH | -7.38                 | 3.89           |
| 1d             | CH <sub>3</sub> SCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -   | -6.97                 | 7.78           |
| 2d             | CH <sub>3</sub> SCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -   | -3.67                 | 2030           |
| 1e             | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                        | -10.57                | 0.0176         |
| 2e             | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                        | -7.81                 | 1.9            |
| 1f             | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>        | -10.78                | 0.0125         |
| 2f             | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>        | -7.82                 | 1.84           |
| 1g             | Trp  | -8.53                 | 0.552          |
| 2g             | Trp  | -6.31                 | 23.5           |
| Nifedipina     |  | -4.13                 | 939            |
| Etosuccimida   |  | -5.91                 | 46.7           |

En general, en esta fase del estudio, ambas series de isoindolinas poseen buena afinidad con el canal de Ca<sup>2+</sup>, sin embargo, las isoindolinas sintetizados a partir de metionina, compuestos 1 y 2d, poseen valores de  $\Delta G$  menores



comparadas con sus homólogos, lo cual sugiere que el azufre sea un átomo que no favorezca la interacción de estos compuesto con el poro interno del canal. Por otra parte, se observa que los compuestos que presentaron mayor afinidad son aquellos que poseen un anillo aromático como grupo funcional (R). Sin embargo, existen varios grupos funcionales que podrían modificar la densidad electrónica del anillo aromático y del átomo de N, lo cual a su vez, podría modificar la afinidad de los compuestos. Las interacciones de tipo  $\pi - \pi$  juegan un papel importante en estas interacciones debido a que aportan gran estabilidad a las interacciones dadas entre los compuestos y el poro interno del canal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, los compuestos con mayor afinidad fueron aquellos que dentro de su estructura química poseen un radical aromático, en donde los electrones  $\pi$  son abundantes, lo cual permite deducir que las interacciones más favorable son de tipo  $\pi - \pi$ . Asimismo, todas las isoindolinas interacciona en sitios específicos o cerca de ellos, los cuales son la entrada del poro del canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual puede sugerir la selectividad de estos compuestos al canal mencionado **(Trejo, 2014; Mancilla, 2010; Copeland, 2000)**.

Posteriormente se procedió a la síntesis selectiva del derivado éster metílico de triptófano, ligando que presentó la tercera posición en afinidad con la proteína de acuerdo al estudio teórico. En el modelo biológico. En el modelo de inducción de convulsiones por PTZ, se evaluó la actividad anticonvulsivante del derivado de triptófano y se comparó con carbamazepina y etosuccimida, ambos medicamentos, empleados en el tratamiento de las crisis convulsivas. Compuesto sintetizado mostró una alta eficacia para prevenir las crisis convulsivas. *In vivo*, la isoindolina mostro una alta eficacia a prevenir las crisis convulsivas al ser contrastada las dosis ensayadas con los grupos farmacológicos y grupo vehículo (Figura 4) **(Acosta-Hernández, 2009)**.

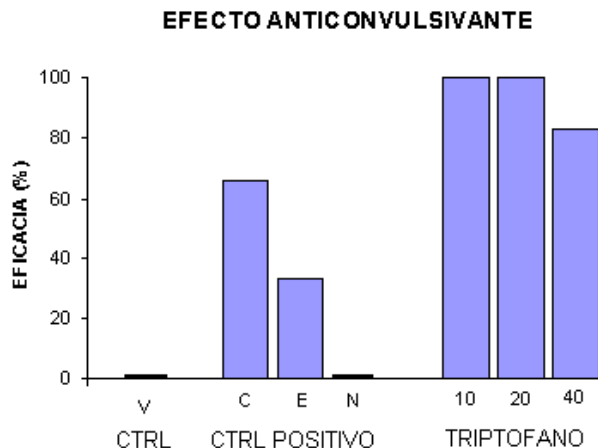


Figura 4. Eficacia anticonvulsivante de la isoindolina derivada de triptófano comparación con la carbamazepina (C), etosuccimida (E) y nifedipina (N), y control (V) (Acosta-Hernández, 2009).

Para la variable de tiempo de latencia a la crisis convulsiva se encontraron diferencias significativas entre las dosis del derivado de triptófano al ser contrastadas con el vehículo y nifedipina. Si bien, no existen diferencias entre las dosis de isoindolina y los controles farmacológicos, se observó una disminución en el tiempo de latencia del derivado comparado con carbamazepina y etosuccimida (Figura 14) (Acosta-Hernández, 2009).

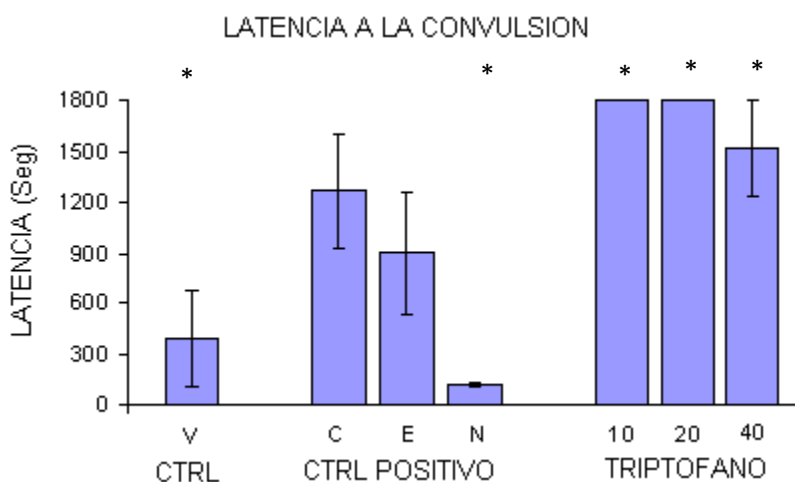


Figura 5. Latencia a la convulsión de la isoindolina derivada del triptófano en comparación con carbamazepina (C), etosuccimida (E) y nifedipina (N) y el grupo vehículo (V) (**Acosta-Hernández, 2009**).

Para la variable duración, el análisis estadístico no mostró diferencias estadísticas para las dosis ensayadas del derivado de triptófano. Si bien, no existen diferencias significativas entre las dosis de trabajo con respecto a los controles farmacológicos, se observó un tiempo menor para la duración de las crisis convulsivas de las dosis de isoindolina comparadas con carbamazepina y etosuccimida (Figura 6) (**Acosta-Hernández, 2009**).

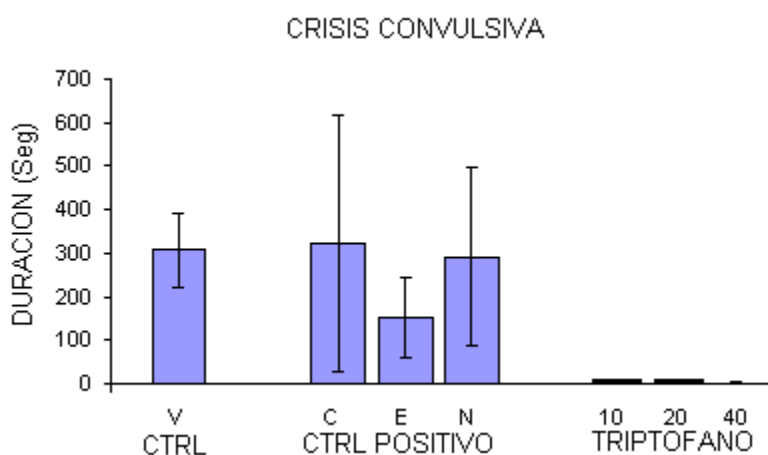


Figura 6. Efecto de los tratamientos sobre el tiempo de duración de la crisis convulsiva. Si bien no existen diferencias entre el derivado de isoindolina con respecto a los controles farmacológicos, que este compuesto reduce el tiempo de duración de las crisis convulsivas (**Acosta-Hernández, 2009**).

El análisis estadístico para el tiempo de recuperación a la crisis convulsiva, determinó que no existen diferencias significativas entre las diferentes dosis ensayadas del derivado de triptófano, asimismo, se obtuvieron diferencias significativas entre estas al ser contrastadas con el grupo vehículo y nifedipina. De igual manera se observó que la actividad del compuesto evaluado es mayor al

compararse con los controles farmacológicos, debido a que se observa un tiempo de recuperación menor de a la crisis convulsiva (**Acosta-Hernández, 2009**).

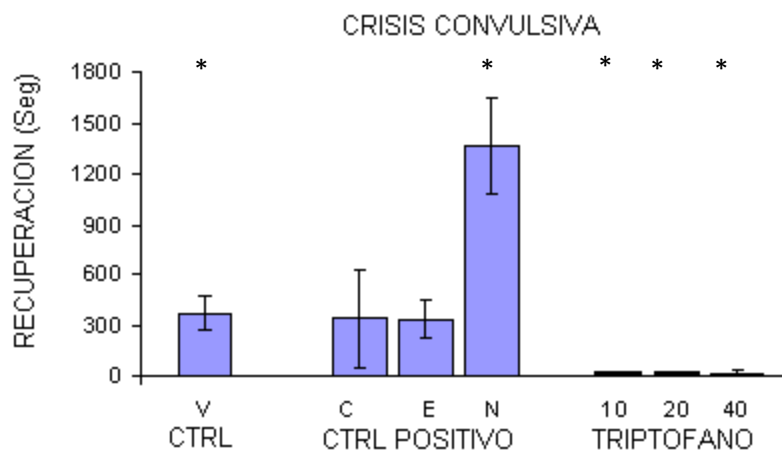


Figura 7. Tiempo de recuperación a la crisis convulsiva. Duración de la crisis convulsiva de la isoindolina derivada del triptófano en comparación con la carbamazepina (C), etosuccimida (E) y nifedipina (N) y control (V) (**Acosta-Hernández, 2009**).

### Apéndice III

Los resultados de las pruebas de laboratorio de las enzimas evaluadas se muestran a continuación.

La tabla 2 muestra los resultados para la enzima aspartato aminotransferasa (AST).

| <b>Valores de las muestras sanguíneas para la enzima AST:</b> |                    |                    |                     |                    |                     |
|---|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| <b>Tratamiento</b>  | <b>Día 1 (U/L)</b> | <b>Tratamiento</b> | <b>Día 16 (U/L)</b> | <b>Tratamiento</b> | <b>Día 31 (U/L)</b> |
| Vehículo  | 214                | Vehículo           | 348                 | Vehículo           | 270                 |
| Vehículo  | 377                | Vehículo           | 192                 | Vehículo           | 360                 |
| Vehículo  | 690                | Vehículo           | 173                 | Vehículo           | 310                 |
| Vehículo  | 336                | Vehículo           | 326                 | Vehículo           | 270                 |
| Vehículo  | 500                | CBZ                | 310                 | Vehículo           | 290                 |
| Vehículo  | 196                | CBZ                | 242                 | Vehículo           | 320                 |
| CBZ   | 313                | CBZ                | 440                 | CBZ                | 300                 |
| CBZ   | 603                | CBZ                | 670                 | CBZ                | 610                 |
| CBZ   | 696                | CBZ                | 500                 | CBZ                | 240                 |
| CBZ   | 500                | CBZ                | 250                 | CBZ                | 890                 |
| Iso   | 266                | Iso                | 280                 | CBZ                | 290                 |
| Iso   | 173                | Iso                | 290                 | CBZ                | 340                 |
| Iso   | 159                | Iso                | 220                 | Iso                | 570                 |
| Iso   | 234                | Iso                | 340                 | Iso                | 350                 |
| Iso   | 202                | Iso                | 200                 | Iso                | 270                 |
| Iso   | 352                | Iso                | 300                 | Iso                | 480                 |
|   |                    |                    |                     | Iso                | 500                 |
|   |                    |                    |                     | Iso                | 700                 |

La tabla 3 muestra los valores para la enzima alanina aminotransferasa (ALT).

| <b>Valores de las muestras sanguíneas para la enzima ALT:</b> |                    |                    |                     |                    |                     |
|---|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| <b>Tratamiento</b>  | <b>Día 1 (U/L)</b> | <b>Tratamiento</b> | <b>Día 16 (U/L)</b> | <b>Tratamiento</b> | <b>Día 31 (U/L)</b> |
| Vehículo  | 79                 | Vehículo           | 115                 | Vehículo           | 100                 |
| Vehículo  | 75                 | Vehículo           | 73                  | Vehículo           | 84                  |
| Vehículo  | 388                | Vehículo           | 71                  | Vehículo           | 98                  |
| Vehículo  | 109                | Vehículo           | 93                  | Vehículo           | 80                  |
| Vehículo  | 416                | CBZ                | 72                  | Vehículo           | 64                  |
| Vehículo  | 40                 | CBZ                | 64                  | Vehículo           | 90                  |
| CBZ   | 102                | CBZ                | 550                 | CBZ                | 80                  |
| CBZ   | 164                | CBZ                | 58                  | CBZ                | 260                 |
| CBZ   | 133                | CBZ                | 199                 | CBZ                | 70                  |
| CBZ   | 127                | CBZ                | 59                  | CBZ                | 90                  |
| Iso   | 28                 | Iso                | 63                  | CBZ                | 80                  |
| Iso   | 40                 | Iso                | 74                  | CBZ                | 90                  |
| Iso   | 45                 | Iso                | 62                  | Iso                | 90                  |
| Iso   | 54                 | Iso                | 74                  | Iso                | 60                  |
| Iso   | 29                 | Iso                | 75                  | Iso                | 90                  |
| Iso   | 89                 | Iso                | 75                  | Iso                | 100                 |
|   |                    |                    |                     | Iso                | 90                  |
|   |                    |                    |                     | Iso                | 110                 |

La tabla 4 muestra los resultados para la enzima fosfatasa alcalina (FA).

| <b>Valores de las muestras sanguíneas para la enzima FA:</b> |                     |                    |                      |                    |                      |
|--|---------------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| <b>Tratamiento</b>   | <b>Día 1 (UI/L)</b> | <b>Tratamiento</b> | <b>Día 16 (UI/L)</b> | <b>Tratamiento</b> | <b>Día 31 (UI/L)</b> |
| Vehículo   | 89                  | Vehículo           | 126                  | Vehículo           | 220                  |
| Vehículo   | 132                 | Vehículo           | 77                   | Vehículo           | 200                  |
| Vehículo   | 98                  | Vehículo           | 179                  | Vehículo           | 190                  |
| Vehículo   | 98                  | Vehículo           | 77                   | Vehículo           | 250                  |
| Vehículo   | 154                 | CBZ                | 61                   | Vehículo           | 180                  |
| Vehículo   | 227                 | CBZ                | 112                  | Vehículo           | 240                  |
| CBZ  | 80                  | CBZ                | 65                   | CBZ                | 110                  |
| CBZ  | 61                  | CBZ                | 63                   | CBZ                | 70                   |
| CBZ  | 137                 | CBZ                | 83                   | CBZ                | 85                   |
| CBZ  | 119                 | CBZ                | 95                   | CBZ                | 90                   |
| Iso  | 231                 | Iso                | 144                  | CBZ                | 91                   |
| Iso  | 161                 | Iso                | 70                   | CBZ                | 220                  |
| Iso  | 188                 | Iso                | 102                  | Iso                | 60                   |
| Iso  | 78                  | Iso                | 107                  | Iso                | 31                   |
| Iso  | 214                 | Iso                | 107                  | Iso                | 210                  |
| Iso  | 168                 | Iso                | 141                  | Iso                | 83                   |
|  |                     |                    |                      | Iso                | 85                   |
|  |                     |                    |                      | Iso                | 62                   |

La tabla 5 muestra los resultados de laboratorio para la bilirrubina total.

| <b>Valores de las muestras sanguíneas para el analito TBIL:</b> |                      |                    |                       |                    |                       |
|---|----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| <b>Tratamiento</b>  | <b>Día 1 (mg/dl)</b> | <b>Tratamiento</b> | <b>Día 16 (mg/dl)</b> | <b>Tratamiento</b> | <b>Día 31 (mg/dl)</b> |
| Vehículo  | 0.4                  | Vehículo           | 0.6                   | Vehículo           | 1.0                   |
| Vehículo  | 1.2                  | Vehículo           | 0.4                   | Vehículo           | 0.1                   |
| Vehículo  | 0.9                  | Vehículo           | 0.2                   | Vehículo           | 0.3                   |
| Vehículo  | 1.6                  | Vehículo           | 0.9                   | Vehículo           | 0.1                   |
| Vehículo  | 1.6                  | CBZ                | 0.5                   | Vehículo           | 0.3                   |
| Vehículo  | 0.7                  | CBZ                | 0.5                   | Vehículo           | 0.1                   |
| CBZ   | 0.8                  | CBZ                | 1.5                   | CBZ                | 0.5                   |
| CBZ   | 2.4                  | CBZ                | 0.4                   | CBZ                | 1.5                   |
| CBZ   | 4.9                  | CBZ                | 1.3                   | CBZ                | 1                     |
| CBZ   | 1.2                  | CBZ                | 0.3                   | CBZ                | 0.3                   |
| Iso   | 2.8                  | Iso                | 0.5                   | CBZ                | 1.3                   |
| Iso   | 0.6                  | Iso                | 0.7                   | CBZ                | 1                     |
| Iso   | 0.1                  | Iso                | 0.2                   | Iso                | 1.3                   |
| Iso   | 0.4                  | Iso                | 0.4                   | Iso                | 1                     |
| Iso   | 0.5                  | Iso                | 0.2                   | Iso                | 0.8                   |
| Iso   | 0.8                  | Iso                | 0.2                   | Iso                | 1.5                   |
|   |                      |                    |                       | Iso                | 1.7                   |
|   |                      |                    |                       | Iso                | 3                     |



La tabla 6 muestra los resultados de laboratorio para la bilirrubina indirecta.

| <b>Valores de las muestras sanguíneas para el analito BI:</b> |                      |                    |                       |                    |                       |
|---|----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| <b>Tratamiento</b>  | <b>Día 1 (mg/dl)</b> | <b>Tratamiento</b> | <b>Día 16 (mg/dl)</b> | <b>Tratamiento</b> | <b>Día 31 (mg/dl)</b> |
| Vehículo  | 0.1                  | Vehículo           | 0                     | Vehículo           | 0.1                   |
| Vehículo  | 0                    | Vehículo           | 0                     | Vehículo           | 1.8                   |
| Vehículo  | 0                    | Vehículo           | 0                     | Vehículo           | 0.4                   |
| Vehículo  | 0                    | Vehículo           | 0.1                   | Vehículo           | 0.9                   |
| Vehículo  | 0                    | CBZ                | 0.1                   | Vehículo           | 0.4                   |
| Vehículo  | 0                    | CBZ                | 0.2                   | Vehículo           | 1.5                   |
| CBZ   | 0                    | CBZ                | 0                     | CBZ                | 3                     |
| CBZ   | 0                    | CBZ                | 0.2                   | CBZ                | 0.5                   |
| CBZ   | 0                    | CBZ                | 0                     | CBZ                | 1.5                   |
| CBZ   | 0.1                  | CBZ                | 0                     | CBZ                | 3                     |
| Iso   | 0                    | Iso                | 0.1                   | CBZ                | 2                     |
| Iso   | 0.1                  | Iso                | 0                     | CBZ                | 0.9                   |
| Iso   | 0                    | Iso                | 0                     | Iso                | 0.1                   |
| Iso   | 0                    | Iso                | 0.1                   | Iso                | 0.1                   |
| Iso   | 0                    | Iso                | 0.2                   | Iso                | 3                     |
| Iso   | 0                    | Iso                | 0                     | Iso                | 3                     |
|   |                      |                    |                       | Iso                | 0.1                   |
|   |                      |                    |                       | Iso                | 0.2                   |

La tabla 7 muestra los resultados para la bilirrubina directa.

| <b>Valores de las muestras sanguíneas para el analito BD:</b> |                      |                    |                       |                    |                       |
|---|----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| <b>Tratamiento</b>  | <b>Día 1 (mg/dl)</b> | <b>Tratamiento</b> | <b>Día 16 (mg/dl)</b> | <b>Tratamiento</b> | <b>Día 31 (mg/dl)</b> |
| Vehículo  | 0                    | Vehículo           | 0.2                   | Vehículo           | 0.3                   |
| Vehículo  | 0.7                  | Vehículo           | 0                     | Vehículo           | 1                     |
| Vehículo  | 0.6                  | Vehículo           | 0                     | Vehículo           | 0.5                   |
| Vehículo  | 0.6                  | Vehículo           | 0                     | Vehículo           | 1                     |
| Vehículo  | 0.5                  | CBZ                | 0                     | Vehículo           | 0.7                   |
| Vehículo  | 0.1                  | CBZ                | 0                     | Vehículo           | 1                     |
| CBZ   | 0.1                  | CBZ                | 0.9                   | CBZ                | 1.7                   |
| CBZ   | 0.4                  | CBZ                | 0                     | CBZ                | 3                     |
| CBZ   | 1.1                  | CBZ                | 0.4                   | CBZ                | 2                     |
| CBZ   | 0                    | CBZ                | 0                     | CBZ                | 1.5                   |
| Iso   | 1                    | Iso                | 0                     | CBZ                | 0.1                   |
| Iso   | 0                    | Iso                | 0.2                   | CBZ                | 1                     |
| Iso   | 0                    | Iso                | 0                     | Iso                | 1.7                   |
| Iso   | 0                    | Iso                | 0                     | Iso                | 1.5                   |
| Iso   | 0.2                  | Iso                | 0                     | Iso                | 0                     |
| Iso   | 0.4                  | Iso                | 0                     | Iso                | 2                     |
|   |                      |                    |                       | Iso                | 1.5                   |
|   |                      |                    |                       | Iso                | 1.7                   |