

Evaluación del efecto coadyuvante de 2H-cromen-2-ona para la prevención de convulsiones inducidas experimentalmente en ratones de laboratorio.

Ángela Viviana Núñez Medina

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2023

Evaluación del efecto coadyuvante de 2H-cromen-2-ona para la prevención de convulsiones inducidas experimentalmente en ratones de laboratorio

Ángela Viviana Núñez Medina

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias- Farmacología

Director:

MARIO FRANCISCO GUERRERO PABON MD, DSc

Línea de Investigación:
Farmacología Experimental del Sistema Nervioso
Grupo de Investigación:
FARMOL

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2023

A mi mamá por su motivación y ser mi apoyo incondicional, a Julián por su apoyo en esta aventura, a mi familia porque son el motor de mi vida y a mis gatos por su compañía en el desarrollo de esta meta.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto dende ha recepción las ideas, los palabras, e materiales de etros autores.

donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y

referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de

texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

ABOA WAA NOOT

Angela Viviana Nuñez Medina

Fecha 01/02/2023

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, a la facultad de Ciencias y al Departamento de Farmacia, por brindarme la oportunidad de aprender y crecer como profesional.

Al profesor Mario Francisco Guerrero Pabón, por brindarme su orientación, tiempo y conocimientos para llevar a cabo mi trabajo de grado satisfactoriamente. Al profesor Luis Fernando Ospina director del Bioterio, por sus enseñanzas y aporte a la elaboración del proyecto.

A Julián Alarcón por ser mi apoyo en cada momento que lo necesité y compañía en esta aventura de aprendizaje y crecimiento profesional.

A mis compañeros de maestría y del bioterio, por su ayuda en la realización de las clases, trabajos y desarrollo de los ensayos.

Resumen 6

Resumen

Evaluación del efecto coadyuvante de 2H-cromen-2-ona para la prevención de convulsiones inducidas experimentalmente en ratones de laboratorio

La epilepsia es una enfermedad potencialmente neurodegenerativa crónica que afecta a humanos y animales. La mayoría de los pacientes requieren la prescripción de fármacos antiepilépticos (FAE), no obstante, alrededor del 30% de ellos no presentan resolución completa de sus convulsiones, por lo que se categorizan como pacientes refractarios, es decir, individuos que a pesar de tener un régimen médico no tienen control de estas. Dicha condición hace que su calidad de vida se afecte.

Por dicha particularidad de resistencia farmacológica, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto como coadyuvante de cumarina (2H-cromen-2-ona) en la prevención de convulsiones. En este trabajo se evaluó la respuesta por parte de ratones de laboratorios en modelos de inducción de convulsión bajo los efectos de fármacos antiepilépticos como lo fueron carbamazepina, ácido valproico y levetiracetam, el uso de cumarina y la combinación de fármaco y cumarina, en estímulos de electroshock de alta intensidad (MES), modelo de baja frecuencia (6 Hz) e inducción química con pentilentetrazol (PTZ), adicionalmente se evaluó la neurotoxicidad aguda mediante la prueba de eje rodante (Rotarod).

De la evaluación de cumarina (2H-cromen-2-ona), en primer lugar, en la prueba de eje rodante, se encontró que no hubo una alteración significativa en la motricidad de los individuos. En cuanto a los datos obtenidos en los ensayos de inducción de convulsión se pudo determinar que la combinación de carbamazepina y cumarina tuvo un potencial efecto anticonvulsivante en el modelo de MES, para los otros modelos se encontró una significancia menor con respecto al de MES.

Los datos proporcionados en el documento sugieren que el uso en combinación de cumarina (2H-cromen-2-ona) con fármacos prototipo de primera línea en modelos de ratones, ejercería efectos anticonvulsivantes y un posible efecto sinérgico.

Palabras clave: Epilepsia, cumarina, pentilentetrazol, MES, 6 Hz, convulsión, anticonvulsivo.

Abstract

Evaluation of the adjuvant effect of (2H-chromen-2-one) for the prevention of experimentally induced seizures in laboratory mice.

Epilepsy is a potentially chronic neurodegenerative disease that affects humans and animals. The majority of patients require the prescription of antiepileptic drugs (AEDs). However, around 30% of them do not present complete resolution of their seizures, which is why they are categorized as refractory patients, that is, individuals who, despite having a medical regimen, have no control over these. This condition affects their quality of life.

Due to this particularity of pharmacological resistance, the goal of this work was to evaluate the effect of coumarin (2H-chromen-2-one) as an adjuvant in the prevention of seizures. In this work, the response of laboratory mice in models of seizure induction under the effects of antiepileptic drugs such as carbamazepine, valproic acid, and levetiracetam, the use of coumarin and the combination of drug and coumarin, was evaluated in stimulation high-intensity electroshock (MES), low-frequency model (6 Hz), and chemical induction with pentylenetetrazol (PTZ), additionally acute neurotoxicity was evaluated using the rolling axis test (Rotarod).

From the evaluation of coumarin (2H-chromen-2-one), first of all, in the rolling axis test, it was found that there was no significant alteration in the motor skills of the individuals. Regarding the data obtained in the seizure induction trials, it was possible to determine that the combination of carbamazepine and coumarin had a potential anticonvulsant effect in the MES model, lower significance was found at the other models concerning the MES model.

The data provided in the document suggest that the use of coumarin (2H-chromen-2-one) in combination with first-line prototype drugs in mouse models would exert anticonvulsant effects and a possible synergistic effect.

Keywords: Epilepsy, coumarin, pentylenetetrazole, MES, 6 Hz, seizure, anticonvulsant.

Contenido

	Pág.
ntroducción	18
Objetivo general	20
o Objetivos específicos:	20
1. Marco Teórico	21
1.1 Epilepsia	21
1.1.1. Clasificación de las convulsiones	23
1.2 Fármacos antiepilépticos	26
1.3 Cumarinas	28
1.3.1. Generalidades de las cumarinas	28
1.3.2. Usos terapéuticos	29
1.3.3. Historia del arte	30
1.3.4. Hygrophila tyttha Leonard	30
1.4 Toxicidad de las cumarinas	32
1.5 Modelos convulsivos	33
1.5.1. Convulsiones inducidas por electroshock de máxima intensidad (MES)	33
1.5.2. Convulsiones inducidas por estímulo de baja intensidad	34
1.5.3. Convulsiones inducidas químicamente (PTZ - Pentilentetrazol)	35
1.5.4. Eje rodante (Rotarod)	35
1.6. Alternativas a la farmacorresistencia:	37
1.7. Cuantificación de la actividad sinérgica:	39
1.7.1. Modelo de Independencia de Bliss:	40
1.7.2. Modelo de aditividad de Loewe:	41

2.	Met	odología	42
:	2.1	Animales de experimentación	42
:	2.2	Fármacos, patrones, reactivos y equipos	43
:	2.3	Pruebas anticonvulsivantes	45
	2.3.	1 Prueba de neurotoxicidad	45
	2.3.	2 Modelo de inducción de convulsión por electroshock de máxima intensidad	
	(ME	ES)	46
	2.3.	3 Modelo de inducción química de convulsión con pentilentetrazol (PTZ)	47
	2.3.	4 Modelo de inducción de convulsión de baja intensidad y frecuencia	48
2	2.4	Diseño experimental y análisis estadístico	50
	2.4.	Actividad anticonvulsivante	50
		Fase 1: Evaluación de la combinación de cumarina con agentes de referen	cia
			50
		Fase 2: Evaluación de la actividad sinérgica de cumarina en el modelo de	
	con	vulsión de baja intensidad y frecuencia	53
		2.4.2. Distribución de los animales implementados en los ensayos realizad	os:
			54
		nálisis estadístico	55
2	2.6 C	onsideraciones éticas	55
3.	Res	sultados	57
;	3.1	Neurotoxicidad evaluada con la prueba de eje rodante	57
;	3.2 Eı	nsayos experimentales de convulsión inducida	59
	3.2.	1 Modelo de inducción convulsivo de baja intensidad y frecuencia	61
	3.2.	2 Modelo convulsivo de inducción química por PTZ	63
	3.2.	3 Modelo convulsión de electroshock de máxima intensidad (MES)	64
	3.2.	4 Test de sinergia entre levetiracetam y cumarina	64
4.	Dis	cusión	68
5.	Cor	nclusiones y recomendaciones	71
	5.1	Conclusiones	71
	5.2	Recomendaciones	72

Anexo A: Aval Comité de ética	73
Anexo B: Modelo de aditividad de Loewe.	75
Anexo C: Imágenes del desarrollo de la investigación.	76
Anexo D: Estadística de datos.	79
Bibliografía	94

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Evolución de los fármacos antiepilépticos	27
Figura 1-2. Estructura química de cumarina (IUPAC).	28
Figura 1-3. Hygrophila tyttha Leonard-Acanthaceae.	32
Figura 1-4. Convulsión de mínimo estímulo eléctrico.	34
Figura 1-5. Ilustración esquemática de la configuración y el principio del test de ro	tarod.
	36
Figura 1-6. Representación esquemática de la hipótesis de la farmacorresistencia	en la
epilepsia.	38
Figura 2-1. Protocolo general de distribución por sexo de los ratones para la realiz	ación
de los ensayos.	42
Figura 2-2. Protocolo de suspensión de los cristales de cumarina.	44
Figura 2-3. Esquematización de la administración oral en ratones.	44
Figura 2-4. Representación gráfica del protocolo de Rotarod.	46
Figura 2-5. Esquema de implementación del modelo MES.	47
Figura 2-6. Esquema de implementación del modelo de PTZ.	48
Figura 2-7. Esquema de implementación del modelo de 6 Hz.	49
Figura 2-8. Esquema del desarrollo de los modelos convulsivos con días de realiza	ación
(Ensayo de 6 Hz y PTZ).	52
Figura 2-9. Esquema del desarrollo de los modelos convulsivos con días de realiza	ación
(Ensayo de MES).	52
Figura 2-10. Representación esquemática de la distribución de los animales usado	os en el
ensavo farmacológico.	55

Figura 3-1. Tiempo de mantenimiento sobre el eje rodante (rotarod) pre y post-	
administración	58
Figura 3-2. Tiempo de mantenimiento sobre el eje rodante (rotarod) pre y post-	
administración	58
Figura 3-3. Tiempo de mantenimiento sobre el eje rodante (rotarod) pre y post-	
administración.	59
Figura 3-4. Fracción de protección obtenida en modelo de baja intensidad	62
Figura 3-5. Fracción de protección obtenida en modelo de PTZ	63
Figura 3-6. Fracción de protección obtenida en modelo de MES	64
Figura 3-7. Matriz generada por Combenefit empleando el modelo de Loewe.	66
Figura 3-8. Mapa de superficie generado por Combenefit empleando el modelo de	
Loewe	67

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Definición clínica operativa (práctica) de la epilepsia	21
Tabla 1-2. Clasificación del tipo de convulsión	23
Tabla 1-3. Informe de consenso del grupo de trabajo sobre la epilepsia veterinaria sol	bre
definición, clasificación y terminología de la epilepsia en animales de compañía (ILAE	e
IVETF)	24
Tabla 1-4. Taxonomía de la Hygrophila tyttha Leonard	31
Tabla 1-5. Factores asociados a la farmacorresistencia en pacientes con epilepsia	37
Tabla 2-1. Esquematización de la repartición de los tratamientos para el ensayo de	
sinergia entre levetiracetam y cumarina.	54
Tabla 3-1. Actividad anticonvulsivante de los tratamientos administrados (fármaco de	
elección, cumarina y combinación) para cada uno de los modelos desarrollados.	60
Tabla 3-2. Actividad de sinergia entre fármacos de elección (levetiracetam) y cumarin	a en
el modelo de convulsión de 6 Hz en ratones. Con número de individuos evaluados y	
número de individuos protegidos de convulsiones.	61

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término	
DL50	Dosis letal 50	
FAE	Fármacos antiepilépticos	
GABA	Ácido gama amino butírica	
Hz	Hertz	
ICN	Instituto de Ciencias Naturales	
ILAE	Liga Internacional contra la Epilepsia	
IVETF	International Veterinary Epilepsy TaskForce	
kg	Kilogramo	
mA	Miliamperio	
MES	Maximal electroshock seizure - Electroshock de alta intensidad	
mg	Miligramo	
Min	Minuto	
ml	Mililitro	
ms	Milisegundo	
OMS	Organización Mundial de la Salud	
PTZ	Pentilentetrazol	
Rpm	Revoluciones por minuto	
seg	Segundo	
SNC	Sistema nervioso central	

Abreviatura	Término	
SSN	Solución salina	
VGSC	Canales de sodios dependientes de voltaje	

Introducción

Para la OMS la epilepsia es un trastorno neurológico no transmisible del cerebro, que puede afectar a personas de todas las edades, por lo que tiene un impacto en la calidad de la vida del paciente. En el 2017 el Ministerio de Salud y Protección Social reportó que el 1.3% de la población colombiana padece de esta patología. Los pacientes diagnosticados suelen presentar convulsiones (contracciones y relajaciones musculares rápidas y repetidas), de carácter crónico, recurrente y paroxístico, con compromiso parcial o total de la musculatura esquelética, que pueden llevar a deterioro neurológico progresivo. Adicionalmente esta alteración no es exclusiva de los humanos; se ha reportado un 14% en consultas neurológicas en el área de la medicina veterinaria. (Goiz, 2008).

En la actualidad se realizan tratamientos médicos en los cuales se utilizan fármacos conocidos como antiepilépticos o anticonvulsivantes (FAE), con los que se busca prevenir la aparición de las crisis, o al menos, en pacientes de difícil manejo, disminuir la frecuencia y duración. En la mayoría de los casos, una monoterapia adecuada es suficiente para controlar el trastorno epiléptico, pero se conoce que entre un 20 a 40% de pacientes requieren tratamientos combinados. (Kwan et al., 2010)I

La búsqueda de nuevas moléculas que sirvan de terapia para los trastornos epilépticos data de tiempos antiguos, no obstante, posiblemente con la notable excepción de cannabidiol, no se dispone aún de moléculas de origen natural que hayan superado la fase clínica de experimentación (Aghdash, 2021; Golub et al., 2021). Esto puede deberse en parte al poco interés que despierta en la industria farmacéutica la investigación en productos naturales mientras no se identifiquen compuestos novedosos químicamente susceptibles de protección comercial. Por eso, es la academia la llamada a desarrollar el campo de investigación en "principios naturales bioactivos", incluyendo

aquéllos compuestos ya identificados químicamente, con eventual aplicación en farmacoterapia (Buntin et al., 2021; Frearson et al, 2010).

Desde el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia se han adelantado estudios con diversas especies con posible actividad anticonvulsivante, entre las que se destaca *Hygrophylla tyttha*, la cual en estudios previos mostró efectos protectores en modelos de tamizado en ratones de laboratorio y de la que se aisló cumarina como metabolito activo (Ariza, 2006). En este trabajo se busca avanzar en esta línea de investigación, examinando el posible efecto coadyuvante de cumarina (2H-cromen-2-ona), administrado en combinación con agentes anticonvulsivantes de referencia.

Considerando la importancia que tiene actualmente la terapia combinada como enfoque terapéutico para trastornos epilépticos, particularmente en el escenario de la refractariedad, esta investigación pretende aportar al estudio de cumarina como eventual agente coadyuvante en la terapia farmacológica anticonvulsivante, a través de modelos experimentales de convulsión en ratones de laboratorio.

El interés es explorar el papel coadyuvante de cumarina, como potencial abordaje farmacológico de la epilepsia, puesto que suele ser insuficiente el control completo de las crisis en un porcentaje significativo de pacientes (Germán, 2010); por otro lado, el uso concomitante de otros agentes activos podría llevar a la disminución de la dosis de los tratamientos ya existentes, y con ello, a reducir el amplio perfil de efectos adversos, problema que, entre otros, afecta la calidad de vida del paciente con epilepsia.

El examen del efecto combinado (coadyuvante) de cumarina en modelos experimentales de convulsión en ratones busca avanzar en la línea de investigación previa en la que se detectó este compuesto como molécula de interés farmacológico potencial en el campo de la epilepsia, aislada e identificada en una planta medicinal, *Hygrophylla tyttha* (Ariza, 2007).

Objetivo general

Evaluar el efecto coadyuvante de cumarina (2H-cromen-2-ona) en la prevención de convulsiones inducidas experimentalmente en ratones de laboratorio

o Objetivos específicos:

- Determinar si la cumarina ejerce efectos coadyuvantes con carbamazepina en un modelo de convulsiones tónicas-clónicas generalizadas en ratones de laboratorio.
- Determinar si la cumarina ejerce efectos coadyuvantes con ácido valproico en un modelo de crisis de ausencia en ratones de laboratorio.
- Determinar si la cumarina ejerce efectos coadyuvantes con levetiracetam en un modelo de crisis refractaria en ratones de laboratorio.

1. Marco Teórico

Esta sección se enfoca en la descripción de la epilepsia, su clasificación, los tratamientos actuales y su evolución. Adicionalmente, se describe la estructura, su potencial farmacológico y los posibles efectos adversos de las cumarinas.

1.1 Epilepsia

Epilepsia es el nombre que se le acuñó al trastorno neurológico en el que predomina la interrupción frecuente e impredecible de la función normal del sistema nervioso central (SNC). La Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) y la Oficina Internacional para la Epilepsia, hicieron ajustes a las definiciones para hacerlas más prácticas y aplicables en el entorno médico y no médico. Por lo cual se denominó como "crisis epiléptica" a la presencia de forma transitoria de signos y/o síntomas inducidos por anomalías en la actividad neurológica de manera excesiva o simultánea en el cerebro. "La epilepsia" es un trastorno cerebral, caracterizado por predisposición a la aparición de crisis epilépticas continuas, también se especifica que para considerarse epilepsia deben presentar al menos una crisis epiléptica (Fisher et al, 2014).

Tabla 1-1. Definición clínica operativa (práctica) de la epilepsia.

La epilepsia es una enfermedad cerebral que se define por cualquiera de las siguientes circunstancias:

- 1. Al menos dos crisis no provocadas (o reflejas) con >24 h de separación
- 2. Una crisis no provocada (o refleja) y una probabilidad de presentar nuevas crisis durante los 10 años siguientes similar al riesgo general de recurrencia (al menos el 60 %) tras la aparición de dos crisis no provocadas
- 3. Diagnóstico de un síndrome de epilepsia

Se considera que la epilepsia está resuelta en los sujetos con un síndrome epiléptico dependiente de la edad que han superado la edad correspondiente o en aquellos que se han mantenido sin crisis durante los 10 últimos años y que no han tomado medicación antiepiléptica durante al menos los 5 últimos años.

Fuente: Fisher et al., 2014

En la actualidad se reconocen como factores que precipitan la aparición de las convulsiones, en las que están incluidos la privación del sueño, el estrés emocional, enfermedades infecciosas, ciclo menstrual y el consumo de alcohol (Illingworth et al., 2014). Además, la prevalencia y la naturaleza de los factores desencadenantes en pacientes humanos con epilepsia se ha correlacionado con la edad, el género y el tipo de convulsión (Wassenaar et al., 2014, Balamurugan et al., 2013).

Por lo descrito anteriormente, se destaca la importancia del tratamiento para la epilepsia, siendo hoy en día la primera línea de acción la prescripción de fármacos anticonvulsivantes o antiepilépticos también conocidos como FAE por sus siglas, el fin del tratamiento es la reducción de la frecuencia y el control de las convulsiones. Cabe destacar que los fármacos anticonvulsivantes (FAE) no tienen el potencial de curar, pero sí tienen la capacidad farmacológica de controlar la presencia de convulsiones en casos de uso continuo y siguiendo un régimen frecuente, por lo que es de administración diaria con intervalos que varían según la vida media de cada FAE, los cuales se encuentran entre 8 a 24 horas (Eadie, 1999). Sin embargo, se presentan casos en los cuales no hay control de las convulsiones, a nivel estadístico se conoce que alrededor de un tercio de los pacientes tratados farmacológicamente padecen farmacorresistencia, siendo esta la condición de incapacidad de controlar sus crisis, aunque se encuentre bajo prescripción (monoterapia o terapia combinada) (Kwan et al., 2010). Complementando la anterior condición, no se ha identificado un fármaco con la capacidad de prevenir el desarrollo de la epilepsia, caso particular aquellos pacientes que han sufrido lesiones cerebrales como lo son los traumas craneales (Schachter, 2002).

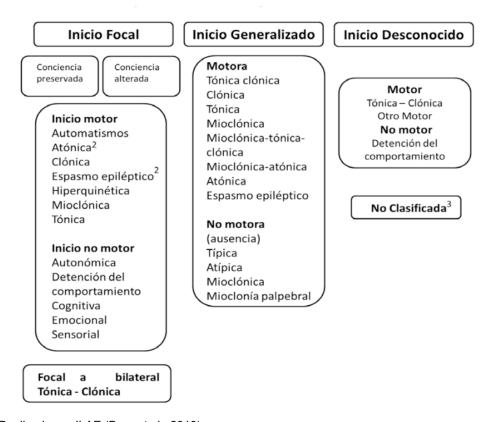
Por lo tanto, el campo de la investigación ha tenido 3 puntos importantes para mejorar la terapia antiepiléptica como lo son: comprender mejor los procesos que desencadenan los episodios convulsivos, reconocer los mecanismos biológicos determinantes de la farmacorresistencia y desarrollar terapias modificadas enfocadas en inhibir el avance de la epilepsia (Stables et al., 2003).

1.1.1. Clasificación de las convulsiones:

La epilepsia se ha clasificado en 4 principales tipos que son:

- Focal
- Generalizada
- Combinación de focal y generalizada
- Desconocido

Tabla 1-2. Clasificación del tipo de convulsión (Versión ampliada).



Fuente: Realizada por ILAE (Berg et al., 2010).

La clasificación de la epilepsia se ha basado en la etiología y las manifestaciones fenotípicas, definidas por la actividad eléctrica anormal del cerebro. Teniendo diferentes definiciones y agrupaciones de términos, dependientes del origen y las características de este.

 Crisis epiléptica focal: se caracterizan por signos de lateralización y/o regiones, entre los signos que se presentan, se habla de: signos motores, autonómicos o conductuales que pueden estar solo o en combinación. Estas crisis se pueden originar en la zona subcortical del cerebro que pueden propagarse hacia el hemisferio contralateral. Es también de destacar que en las crisis focales se presenta una anormalidad eléctrica localizada en un grupo delimitado de neuronas. Dicho esto, dependiendo del grupo de neuronas afectado, la manifestación de la convulsión puede ser: motora (espasmos faciales, movimientos espasmódicos de la cabeza, parpadeó con ritmo, espasmos rítmicos en miembros), autonómico (con componentes parasimpáticos como lo son las pupilas dilatadas, hipersalivación y vómitos) y conductuales (en humanos se manifiestan en fenómenos de convulsión psíquicas o sensoriales, en animales se presenta con cambios cortos de comportamiento como son cuadros agudos de ansiedad, inquietud, miedo o apego inexplicables) (Beredent et al., 2015).

• Crisis epilépticas generalizadas: se caracteriza por la afectación de ambos hemisferios cerebrales, estas pueden tener un origen directamente generalizado o iniciar como una focal que evoluciona. En animales como perros y gatos, se manifiestan con tonicidad, clonos o la combinación de estas dos, en la misma se reporta la pérdida de conciencia del individuo. Otros signos que se generan durante el cuadro de convulsión es la hipersalivación, micción y/o defecación. Cuando se reporta este cuadro se especifica que la convulsión involucra la actividad motora. Es de destacar que también se reportan cuadros generalizados no convulsivos, identificados como atónicos, en los cuales se pierde el tono muscular que produce caídas del individuo (Beredent et al., 2015).

Con el tiempo, esta clasificación ha sido modificada y adaptada a las condiciones clínicas haciendo que sean más prácticas para su uso como guías, agrupando convulsiones con características similares o con definiciones muy cercanas.

Tabla 1-3. Informe de consenso del grupo de trabajo sobre la epilepsia veterinaria sobre definición, clasificación y terminología de la epilepsia en animales de compañía.

ILAE 1981 y 1989	ILAE 2010	Berg y Scheffer 2011
Crisis generalizada son las que presentan cambios físicos (clínicos) y	Las generalizadas se enfocan en el origen de un punto de las redes	

electroencefalografía. Con hallazgos de afectación de ambos hemisferios	bilaterales y rápidamente comprometidas. En dichas redes se encuentra el compromiso de toda la corteza. Las convulsiones generalizadas pueden ser asimétricas	
Las crisis focales (previamente definidas como locales) son aquellas en los primeros cambios clínicos y electroencefalograma, en el cual se enfatiza en un grupo de neuronas limitado a un hemisferio	Las convulsiones focales se enfocan al origen en redes limitadas a un hemisferio. Pueden darse en estructuras subcorticales. Para esta definición se pide más especificidad en la descripción de la convulsión, ya que esto genera más información sobre las manifestaciones de la convulsión que el usar términos como compleja o simple	
Epilepsia idiopática: No tiene una causa subyacente, sino que se habla de una predisposición hereditaria	Epilepsia genética: resultado directo de un defecto de tipo genético conocido o presunto donde el síntoma que predominan son las convulsiones. Pero debe estar respaldado por estudio clínicos	Genética: Resultado directo de una causa genética, es necesario identificar el gen y su mecanismo, también se aplicaría la posibilidad de la replicación en miembros cercanos genéticamente.
Epilepsia sintomática: es inducido por una causa conocido o trastorno sospechoso que afecta el sistema nervioso	Epilepsia estructural y metabólica: son el resultado secundario a una condición estructural o metabólica primaria. Estas condiciones primarias pueden ser adquiridas o genéticas. Ejemplo: una malformación en cerebro o desórdenes metabólicos como una encefalopatía hepática	Estructural-Metabólica: La epilepsia es secundaria a la condición estructural o metabólica del individuo. Aunque también se habla de origen genético se deja en otra clasificación porque es más secundaria la manifestación neurológica.
Epilepsia criptogénica (sintomática): se trata de un trastorno cuya causa	Epilepsia desconocida: el origen es desconocido, pudiendo ser genético o de	Desconocido: Clara y directa se enfatiza en el desconocimiento de la

Fuente: (ILAE e IVETF) (Berendt et al., 2015).

1.2 Fármacos antiepilépticos:

En la historia de la farmacología antiepiléptica se han clasificado en generaciones tres hasta el momento. La primera generación se reporta en los años 1857-1958, los fármacos que están incluidos son: bromuro de potasio, fenobarbital, variaciones de barbitúricos como lo son: fenitoína, primidona, trimetadiona, y etosuximida (Shorvon, 2009). La segunda generación inició su implementación entre 1960-1975, a este grupo pertenecen fármacos como: carbamazepina, valproato y benzodiazepinas (Shorvon, 2009). Como bien se conoce, entre los efectos secundarios de estos fármacos previamente nombrados, se ha identificado la inducción de enzimas, lo que conduce a grandes interacciones con otros fármacos, siendo una condición de importancia a nivel de clínica (Schmidt et al., 2009). Para 1980, se empieza a trabajar con la tercera generación de FAE, la cual inicia con vigabatrina y tiagabina, que se describen como fármacos diseñados para tratar de forma selectiva el posible mecanismo que desencadena la presentación de las convulsiones.

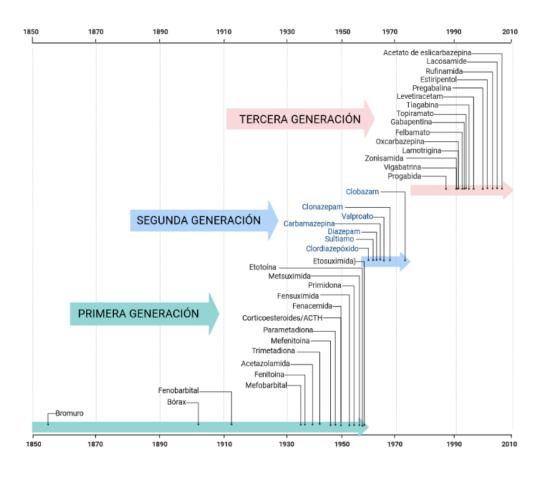


Figura 1-1. Evolución de los fármacos antiepilépticos.

Fuente: Adaptada de datos de Shorvon, 2009. Traducida al español con Biorender.com.

La tercera generación brindó una oportunidad para pacientes que han demostrado necesario un cambio en la prescripción farmacológica que tenían, aun así, esta tercera generación no ha mostrado en todos sus fármacos la eficacia que tienen los FAE de previas generaciones (Brodle et al., 2007). Puntos que se han destacado de estos FAE es que en pacientes con alto grado de tolerancia a tratamientos previos muestran ser un apoyo a la terapia (Beyenburg et al., 2010). Adicionalmente, se ha identificado la disminución de las interacciones medicamentosas, efectos adversos e hipersensibilidad (Elger et al., 2008). Aunque esta evolución en fármacos ha generado una nueva serie de beneficios, también existe la notable preocupación de que la eficacia de estos FAE no cubra todos los campos del tratamiento de la epilepsia (Shorvon, 2009).

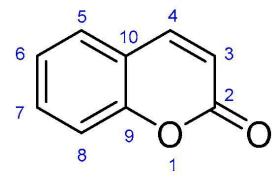
1.3 Cumarinas:

1.3.1. Generalidades de las cumarinas:

Las cumarinas son una familia de metabolitos secundarios con una amplia presencia en plantas, conociéndose alrededor de 1300 cumarinas de origen natural, pero también se han encontrado en hongos y algunos microorganismos (Matos et al., 2015; Borges et al., 2005), siendo algunas de estas usadas en la medicina tradicional. El papel de las cumarinas en las plantas ha sido de defensa, también en la captación de rayos UV, actúan como reguladores del crecimiento, controla transformaciones bioquímicas (Chattha et al., 2018). Se ha reportado el uso de estos productos derivados de cumarina desde hace 200 años. Se identificó el origen, el cual proviene de la planta (*Dypteryx odorata*) de la cual se aisló la propia cumarina, este proceso fue llevado a cabo por Vogel en 1820 (Borge et al., 2005).

Químicamente, las cumarinas son heterociclos (compuestos químicos cíclicos) consta de un anillo de benceno aromático que se fusiona α-pirona (anillo de lactona), cuya nomenclatura fue establecida por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC).

Figura 1-2. Estructura química de cumarina (IUPAC).



Por su gran variedad de estructuras químicas y complejidad se clasifican como: simples, isocumarinas, furocumarinas, piranocumarinas, biscumarinas y fenilcumarinas (Zhu et

al., 2018), dada esta particularidad poseen una amplia gama de acciones farmacológicas, algunas de estas actividades son: anticoagulante, siendo la cumarina más común (Warfarina) (Kumar et al., 2015); antioxidante (Payá et al., 1992), sedante (Apseloff et al., 1991), tranquilizante (Barreiro-Arcos et al., 2006) y neuro protector (Kang et al., 2005), lo que ha atraído el interés por sus diversas propiedades farmacológicas. Cabe destacar que dentro de las pruebas realizadas se ha identificado que la exposición a los compuestos de cumarina ha sido segura en humanos (Annunziata et al., 2020).

Las cumarinas se encuentran con mayor frecuencia en plantas que pertenecen a las familias *Apiaceae*, *Rutaceae*, *Umbelliferae*, *Compositae*, *Leguminosea*, *Oleaceae*. *Moraceae*, *Thymelaeaceae*, *Acanthaceae entre otras* (Matos et al., 2015). Estos compuestos de cumarina están presentes en hojas, frutos, flores y raíces de las plantas (Harborne, 1999). En estudios previos se identificó que en la *Hygrophylla tyttha* planta nativa de Colombia, contiene cumarina y en la medicina tradicional del pacifico nariñense es utilizada como tranquilizante (Ariza et al., 2006; Ariza et al., 2007). Se ha manejado también como acción de las cumarinas la inhibición de histamina y actividad moderada adrenérgica. Condiciones acuñadas por la inhibición de la catecol-O-metil-transferasa, enzima capaz de metabolizar la noradrenalina (Sgaragli et al., 1993).

1.3.2. Usos terapéuticos:

Se reporta que en la familia de las cumarinas se encuentran furocumarinas (psolareno, angelicina, piranocumarinas) (Gorgus et al., 2010). También se han implementado en otras áreas como alimentos, cosméticos, productos farmacológicos, entre las más conocidas anticoagulantes y antibiótico (Bagetta et al., 2010), áreas donde ha tenido gran relevancia la administración de la cumarina conocida como Warfarina por su mecanismo de acción, en la inhibición de la vitamina K, siendo un potente anticoagulante en casos clínicos de tromboembolismos (Holbrook et al., 2005).

Gracias a sus propiedades farmacológicas, se ha vuelto importante la investigación del efecto de las cumarinas en el sistema nervioso central (SNC). Por lo tanto, numerosos estudios experimentales se han llevado a cabo en trastornos como la epilepsia, la

esquizofrenia, los trastornos depresivos y de ansiedad o enfermedad de Alzheimer (Skalicka-Wozniak et al., 2016).

Se ha destacado el particular interés de los efectos sobre el sistema nervioso central (SNC) gracias a su lipofílica y su facilidad en penetrar la barrera hematoencefálica (Skalicka-Wozniak., et al., 2016). Teniendo un valioso potencial en prevención y tratamiento de las enfermedades del SNC, incluyendo su potencial anticonvulsivo. Algunos derivados cumarínicos se han implementado como inhibidores de la acetilcolinesterasa, monoaminooxidasa, dopamina y antagonistas de serotonina. (Abu-Aisheh et al., 2019; Detsi et al., 2017). Es probable que los efectos anticonvulsivantes de las cumarinas estén relacionados con su influencia en el receptor para Ácido γ-aminobutírico (GABA). Esto se ha demostrado en otros estudios, como por ejemplo: las furanocumarinas que son antagonistas parciales de los receptores de benzodiacepinas, mediante la inhibiendo la unión del diazepam a estos receptores (Singhuber et al., 2011).

1.3.3. Estado del arte:

Se reporta un primer estudio realizado en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, en el que se evaluaron los efectos ejercidos del extracto etanólico de la planta *Hygrophylla titha* sobre sistema nervioso central, el cual se efectuó en ratones. Los parámetros que se tuvieron en cuenta en el ensayo fueron: efecto ansiolítico, antidepresivos, anticonvulsivante e hipnótico, como resultado se obtuvo una relevante reducción de los comportamientos de ansiedad dependientes de la dosis administrada vía oral (Ariza et al., 2006).

En otro reporte de estudio, también desarrollado en el Departamento de Farmacia, se evaluó directamente el efecto anticonvulsivante de la cumarina mediante la microencapsulación de esta y su estado libre, en pruebas como electroshock de alta intensidad (MES), indicando un gran porcentaje de protección frente a la inducción de convulsiones (Arango et al., 2015).

1.3.4. Hygrophila tyttha Leonard:

Al género *Hygrophylla* pertenece una gran variedad de plantas que se usa en la medicina tradicional alrededor del mundo en países como Malasia, India y Nepal, algunos fines médicos son: inflamación, patologías hepáticas e infecciones urinarias (Shanmugasundaram et al., 2006). También se le acuñan propiedades antinociceptivas mediante mecanismos periféricos y centrales, que disminuyen la sensibilidad, involucrando el sistema nervioso (Shanmugasundaram et al., 2006).

Tabla 1-4. Taxonomía de la *Hygrophila tyttha* Leonard.

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Scrophulariales
Familia	Acanthaceae
Género	Hygrophila
Epíteto específico	tyttha
Autor	Leonard

Fuente: Colecciones científicas del Instituto de Ciencias Naturales (ICN) de la Universidad Nacional de Colombia.

Se ha localizado a la especie *Hygrophylla tyttha* en regiones como el trópico y subtrópico de centro y Suramérica. En Colombia, se usa, entre otros fines, como insecticidas y aromatizantes (Lamprea, 2009). Se reporta que la comunidad indígena Awá, que se encuentra localizada en la región del Pacifico Nariñense, la utiliza con fines de rituales (Chaves et al, 2006). En algunas otras regiones del país se usa como tranquilizante por lo que se le conoce con el nombre vulgar de "amansaguapos", "amansamachos" o "amansatoros". Por lo anterior, es una especie de gran interés para el estudio de la cumarina presente en ésta, puesto que tiene un efecto relevante en el sistema nervioso.



Figura 1-3. Hygrophila tyttha Leonard-Acanthaceae

Fuente: Colecciones científicas del Instituto de Ciencias Naturales (ICN) de la Universidad Nacional de Colombia. Ciencias Naturales (ICN) de la Universidad Nacional de Colombia.

1.4 Toxicidad de las cumarinas:

Las cumarinas, como se describió previamente, tienen un amplio uso en la industria, desde aditivos alimentarios a medicamentos, por lo que se ha sido importante la evaluación a nivel de toxicidad. Se ha observado que en ratones la dosis letal (DL_{50}) se encuentra en un rango de 196-780 mg/kg (Lake, 1996). Los rasgos destacados de estos niveles de toxicidad se encontraron que en ratones con 7- hidroxicumarina, que es el metabolito de mayor presencia en humanos, es menos tóxico que 3- hidroxicumarina, el

mayor metabolito presente en roedores. Otro dato importante es que la cumarina tiene mayor toxicidad en ratas que en ratones por la presencia del 3-hidroxicumarina, puesto que es una ruta metabólica importante para la rata. Adicional a esta ruta metabólica, se encontró la posible circulación enterohepática de los metabólicos, lo que aumentaría la susceptibilidad de las ratas a presentar hepatotoxicidad (Fentem et al., 1993).

En estudios de toxicidad subcrónica y crónica en ratones, en los cuales se usaron dosis de 19 – 300 mg/kg y concentraciones de 300 – 3000 ppm de cumarina implementado hasta por 2 años, los hallazgos no mostraron signos de toxicidad en todos los casos, pero sí indicaron algunas alteraciones a nivel hepático (Lake et al., 1996; Carlton et al., 1996). La toxicidad de la cumarina es una respuesta más de la especie, la cual se ha relacionado con la capacidad metabólica después de la exposición, como es el caso de los humanos, quienes son menos susceptibles comparado con las ratas (Felter et al., 2005).

La literatura reporta que la cumarina (2-cromenona) y otros derivados cumarínicos entre ellos 6,7 – dihidroxicumarina, 6,7-dimetoxicumarina, han mostrado efectos protectores hepáticos frente a daños inducidos por CCL⁴ en ratas (Bilgin et al., 2010).

1.5 Modelos convulsivos:

Los modelos son representaciones guías para la interpretación y creación de nuevos conocimientos de la patología que se está desarrollando. Se cuenta con una serie de modelos como lo son la implementación en animales que permite la investigación de diferentes mecanismos como picos epilépticos, estatus epilépticos, epilepsia y desarrollo de algunas nuevas moléculas con potencial farmacológico (Pitkänen et al., 2017).

Los modelos animales de convulsiones inducidas por estimulación eléctrica transmiten información sobre la reproducción de características epileptógenas en el cerebro, los protocolos de estimulación pueden ser costosos y laboriosos cuando se utilizan para estudios crónicos. (Pitkänen et al., 2006).

1.5.1. Convulsiones inducidas por electroshock de máxima intensidad (MES): Es uno de los modelos más empleados para generar

convulsiones tónico-clónicas generalizadas. Se realiza mediante la estimulación eléctrica, por lo cual se implementa para el desarrollo de nuevo FAE, con el fin de identificar protección contra convulsiones.

En este modelo las convulsiones son inducidas mediante la descarga eléctrica que es capaz de llegar al cerebro, lo que genera una convulsión, esta se presenta con una flexión tónica, seguida por una extensión tónica de las miembros posteriores del animal y finaliza con una convulsión de características clónicas. (Giardina, 2000).

Los fármacos que han mostrado mayor eficacia en el tratamiento de convulsiones tónico/clónico generalizadas son fenitoína, carbamazepina, ácido valproico y fenobarbital, demostrando que tiene gran capacidad de controlar y prevenir las convulsiones inducidas por electroshock en modelos realizados en ratones (Giardina, 2000).

1.5.2. Convulsiones inducidas por estímulo de baja intensidad: Se basa en la estimulación eléctrica a 6 Hz mediante electrodos corneales durante 3 segundos, induciendo una menor propagación de la convulsión comparado con el modelo MES.

Este modelo se caracteriza por inmovilidad del individuo (aturdimiento), también presentan clonos de los miembros en especial posteriores y comportamientos estereotipados, como se muestra en la **figura 1-4**, los cuales se asemejan a las convulsiones límbicas presentadas en humanos (Swinyard, 1972). Este modelo se usa en estudios de fármaco-resistencia a los tratamientos de la epilepsia (Barton et al., 2001).

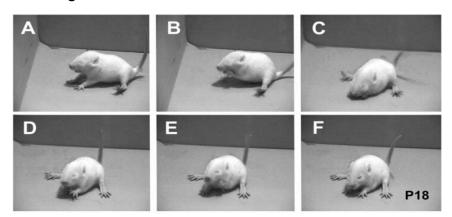


Figura 1-4. Convulsión de mínimo estímulo eléctrico.

Fuente: (Pavel et al., 2006).

1.5.3. Convulsiones inducidas químicamente (PTZ - Pentilentetrazol): Es un antagonista del GABA, por tal motivo es el fármaco de amplio uso como inductor de convulsiones (Huang et al., 2002). La administración en animales de laboratorio por vía subcutánea en dosis entre 60 a 120 mg/kg, siendo dosis inductoras de convulsión de tipo clónica entre 70 a 85 mg/kg. La presentación del cuadro convulsivo se caracteriza por episodios espasmódicos musculares repetidos los que deben tener una duración mínima de 5 segundos (Giardina, 2000). Una vez se administra el PTZ tiene una absorción aproximadamente de 15 a 30 min, tiempo de duración en el cual se va a evidenciar la aparición de la crisis convulsiva.

Este modelo es útil en convulsiones mioclónicas y crisis ausentes. Se ha validado como un modelo útil para conocer la eficacia de fármacos anticonvulsivos como ácido valproico, fenobarbital, gabapentina y benzodiacepinas, entre otras.

1.5.4. Eje rodante (Rotarod): Es una prueba que permite evaluar los efectos que ejerce una sustancia con efecto farmacológico sobre el comportamiento de los ratones, mediante la evaluación del rendimiento motor en roedores utilizando el miedo natural a caerse como motivación. El equipo cuenta con una barra horizontal que gira sobre su eje, también dispone de

divisiones que demarcan los carriles para cada ratón, por este medio el animal debe caminar hacia delante para mantenerse erguido y no caerse. Puesto que la coordinación.

Se debe sostener al ratón de la cola y colocarlo en la barra giratoria para que este se camine hacia delante. Lo ideal del ingreso del ratón al equipo es bajar al ratón para que este extienda sus patas, permitiendo un agarre más fácil de la varilla. Transcurridos los primero 10 segundos de hacer colocado al ratón en la varilla, se comienza a modificar la aceleración del equipo, la recomendación es que para hacer esta variación el ratón debe estar mirando hacia delante para que sea más fácil su adaptación.

Si el ratón cae antes de los 10 segundos se toma el tiempo de caída y se hace un nuevo intento, hasta un total de 3 intentos por individuo. Si la caída se genera antes de los 5 segundos se toma como caída por mala colocación y no se tiene en cuenta. Se tiene en cuenta la velocidad y el tiempo en la barra giratoria (Diácono, 2013).

Sin embargo, debe considerarse esta prueba como un inicio para detección de posibles lesiones neuromusculares. Para la identificación de otras lesiones neuromusculares se sugiere el uso de análisis más especializados, para caracterizar los aspectos específicos del fármaco evaluado (Castagné et al., 2014).

TEST DE ROTAROD 1 2 3 Control Rotación Rotarod El raton debe mantener el El raton puede ser evaluado a Se compara el tiempo del raton del equilibrio en el equipo, el tiempo diferente velocidad o prueba con el raton de control. de duracion hasta que caer es paulatinamente aumentar la Generalmente el raton de prueba tomado como la medida aceleración suele caer mas rápido

Figura 1-5. Ilustración esquemática de la configuración y el principio del test de rotarod.

Fuente: Lubrich et al., 2022. Traducido al español con Biorender.com.

1.6. Alternativas a la farmacorresistencia:

Actualmente, se habla de un 30 a 40% de los pacientes tratados con FAE que presenta un grado de resistencia (Mohanraj et al., 2005), por lo que es necesario conocer nuevas moléculas o tratamientos que tengan una mejora, desarrollando nuevos caminos para este trastorno el cual tiene diferentes factores que alteran la asimilación de los tratamientos actuales, como se puede evidenciar en la **tabla 1-5**.

Tabla 1-5. Factores asociados a la farmacorresistencia en pacientes con epilepsia.

- Edad temprana de inicio.
- 2. Tipo de crisis: mayor frecuencia en epilepsia con crisis generalizadas y ausencias atípicas
- Etiología: más frecuentes en casos con alteraciones estructurales: Epilepsia sintomática: esclerosis mesial.

Disgenesia cortical.

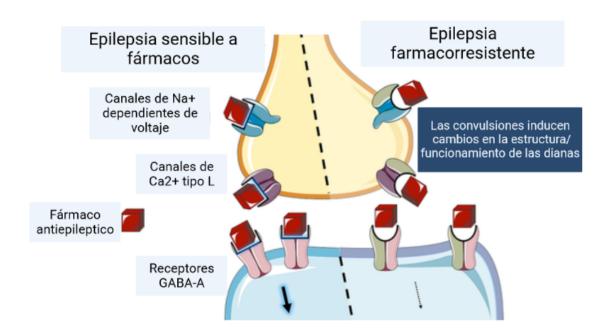
- Epilepsia criptogénica.
- 4. Número de crisis al iniciar fármacos antiepilépticos.
- 5. Ausencia del primer fármaco antiepiléptico.

Fuente: Torres et al., 2007

De acuerdo con algunos autores se tiene una hipótesis de la farmacorresistencia en la epilepsia basada en la pérdida de la eficacia terapéutica como consecuencia de alteraciones directamente en las dianas terapéuticas del paciente como lo son: las alteraciones en los canales de sodio dependientes de voltaje (VGSC) y en los receptores de ácido γ-aminobutírico (GABA). En la **figura 1-6**, se esquematiza la hipótesis en la cual se indica que las convulsiones inducen el cambio de las estructuras y/o funcionamiento de las dianas terapéuticas, induciendo a la falta de sensibilidad de los FAE (Fonseca-Barrientos et al., 2021). Algunos autores han encontrado modificaciones a nivel post-traslacionales en los sitios diana, como lo son la fosforilación y glicosilación de los canales iónicos (Remy, 2006).

Continuando con lo anteriormente mencionado, se debe destacar que los canales de sodio son el sitio diana de FAE de primera línea como: carbamazepina, fenitoína, ácido valproico, entre otros (Kohling, 2002). Se han descrito cambios en los canales de sodio, por los cuales se pierde la capacidad de inhibición de estos mediante el uso de fármacos, la cual se explica en algunos casos como un efecto de fosforilación de los canales inducido por la protein cinasa C (Fonseca- Barriendos et al., 2022).

Figura 1-6. Representación esquemática de la hipótesis de la farmacorresistencia en la epilepsia.



Fuente: Creada en Servier Medical Art por Fonseca-Barriendos et al., 2022. Traducida al español con Biorender.com.

El desarrollo de fármacos se encaminó cada vez más a la selectividad o su acción específica sobre un objetivo, marcando la individualización de los compuestos. No obstante, se ha hecho evidente que es necesario recurrir a las terapias combinadas y multifocales para patologías de características complejas como lo es las enfermedades de características neurodegenerativas. El principal objetivo de generar conocimientos de sinergia entre fármacos es superar la posible resistencia al tratamiento, ya que se poseen diferentes mecanismos de acción, visto desde otro ángulo esta particularidad permitirá interactuar desde diferentes orígenes de la patología (Muhammad et al., 2018).

En este punto de desarrollo de conocimiento de la epilepsia y su refractariedad de esta se abre la opción de generar nuevas estrategias con terapia combinada, es decir, dos o más principios activos con diferentes mecanismos de acción, permitiendo superar varios desafíos que en la monoterapia se contemplan. El fin del uso de fármacos combinados es producir un efecto aditivo o sinérgico, principalmente por su interacción con un

objetivo o vía diferente, generado la disminución de las dosis de cada fármaco, pero a la vez, un mayor efecto terapéutico (Ainsworth, 2011; Hopkins, 2008; Sun et al., 2016).

Siendo clave el desarrollo de nuevos FAE, se ha dado la oportunidad de que la investigación se dirija a principios activos no solo sintéticos, sino también de origen natural, bien sea como complemento a la terapia combinada o como monoterapia, considerando que el uso de extractos ha mostrado posibles efectos farmacológicos en medicinas tradicionales. De estas investigaciones previas se han encontrado potenciales anticonvulsivantes en los compuestos flavonoides, (furano)cumarinas, fenilpropanoides y terpenoides ampliamente distribuidos en plantas.

1.7. Cuantificación de la actividad sinérgica:

En la actualidad, es aceptado el concepto de la administración de fármacos en combinación, ya que algunas enfermedades lo requieren (Greco et al, 1995). Considerando la importancia de entender que existe una posible interacción entre compuestos que puede modificar la respuesta al ser suministrados dos o más fármacos a la vez, el efecto resultante puede ser: (i) sinérgica: en la que se observa un aumento ("potenciación") del efecto del fármaco, (ii) antagonismo: acción en la que se disminuye el efecto del fármaco y (iii) aditividad: en la cual las sustancias no tienen una interacción sino que su acción individual es la que muestra respuesta (Geary, 2013). Dicha condición ha generado interés en la evaluación de los posibles efectos de combinación entre sustancias con acción farmacológica.

Las interacciones sinérgicas pueden llegar a reducir efectos secundarios, toxicidad o incluso, la reducción de las dosis individuales de los respectivos fármacos, pero generando el efecto deseado de estos (Greco et al., 1996). Otro punto que se ha identificado en estas interacciones es su potencial en la disminución de la resistencia a los fármacos (Worthington et al., 2013).

Con el fin de medir la actividad sinérgica de una sustancia se han implementado métodos y avances en software de análisis, como es el caso de *Combenefit*, un programa en el cual se puede visualizar, analizar y cuantificar los efectos de combinación de fármacos.

Combenefit implementa el análisis de modelos matemáticos de dosis-respuesta para aquellas combinaciones en las que se pretende establecer el rango de dosis en el que se presentan los efectos anotados: sinergia, antagonismo o aditividad (Greco et al., 1995). El programa maneja tres modelos matemáticos: el modelo de independencia de Bliss, el modelo de aditividad de Loewe y el Highest Single Agent. El software se encuentra de manera gratuita para su uso en Windows.

Entre las prestaciones de la plataforma, se encuentra la de generar un matriz de porcentajes de puntuación de sinergia estimada (100% sinergia máxima, 0% ausencia de sinergia, valores <0: antagonismo) que se puede presentar en un isobolograma tridimensional (Eje X: fármaco 1, Eje Y: fármaco 2, Eje Z: Porcentaje de sinergia), facilitando la identificación rápida del resultado de la interacción (Di Veroli et al., 2016).

1.7.1. Modelo de Independencia de Bliss:

Este modelo se ha usado desde 1930 (Bliss, 1939). Este asume que los fármacos o sustancias con actividad farmacológica no interactúan entre sí y su respuesta se genera de manera independiente (Greco, 1995), dando como resultado que la posibilidad de combinación se da en términos de respuesta individual de las sustancias evaluadas (Bliss, 1939). El método realiza una comparación entre la respuesta combinada observada versus la respuesta combinada prevista, la cual se obtiene de la suposición de que no hay efecto de las interacciones farmacológicas, se determina efecto sinérgico si la respuesta combinada observada es superior a la prevista (Zhao et al., 2014).

1.7.2. Modelo de aditividad de Loewe:

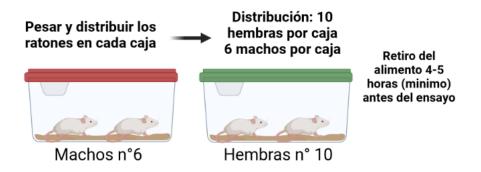
Es el modelo más recientemente desarrollado y su postulado parte del supuesto de que los fármacos evaluados tienen mecanismos de acción y efectos similares (Greco, 1995). El modelo describe: si un fármaco tiene una eficacia del 50% de manera individual en una dosis (1) especifica, una combinación de un fármaco A y un fármaco B a mitad (0,5) de la dosis, debería tener una eficacia del 50%. Habrá sinergia si el resultado arroja valores por encima de los niveles estimados, puesto que se genera un efecto adicional al que proporciona el uso de la dosis de cualquiera de las sustancias por separado (Greco, 1995). Ver anexo B, en donde se describe matemáticamente el modelo de aditividad de Loewe.

2. Metodología

2.1 Animales de experimentación

Se emplearon ratones, hembras y machos CD-1, criados y mantenidos en el laboratorio de experimentación del Departamento de Farmacia, de 8 a 12 semanas de edad y peso aproximado de 25 a 35 gr, con ciclos de 12h de luz y 12 h de oscuridad, temperatura de 21±1°C, con agua y comida a libre disposición excepto el día de la prueba, cuando se sometieron a un ayuno de 5 horas. Los animales se repartieron 6 machos en cada caja y 10 hembras en cada caja, manteniéndolos por separado y con enriquecimiento en cada ambiente. Los ensayos se llevaron a cabo bajo los principios de bioética en el manejo de animales de laboratorio, consignados en la Ley 84 de 1989 y las "Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud" las cuales se establecieron en la Resolución n° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud.

Figura 2-1. Protocolo general de distribución por sexo de los ratones para la realización de los ensayos.



Fuente: Creado con Biorender.com.

2.2 Fármacos, patrones, reactivos y equipos:

Se utilizaron como agentes de referencia, los siguientes patrones (controles positivos): (1) Levetiracetam, para la prueba de convulsión umbral de 6 Hz, (2) Ácido valproico, para la prueba de convulsión por PTZ y (3) Carbamazepina, para la prueba de convulsión por electroshock. Para suspender la cumarina se preparó en un vehículo que contiene glicerina (15%), PPG (15%), polisorbato-80 (2%) y agua destilada en cantidad suficiente para completar el volumen deseado. Los patrones fueron: carbamazepina a dosis de 10 mg/kg (Giardina,2001), ácido valproico a dosis de 300 mg/kg (Giardina,2001) y levetiracetam a dosis de 36 mg/kg (Barton,2001), por último, PTZ se diluyo en solución salina (0.9%) a dosis de 70 mg/kg.

2.2.1. Fármacos:

- Carbamazepina (TEGRETOL® 2%) del laboratorio Novartis de Colombia S.A.
- Acido Valproico (DEPAKENE® 250mg/5ml) de Abbott Laboratories de Colombia S.A.
- Levetiracetam (KEPPRA® 100mg/ml) del GlaxoSmithKline Colombia S.A.
- Cristales de cumarina (Sigma-Aldrich ®) de laboratorios Merck.

2.2.2. Químico Convulsivante:

• Pentilentetrazol (Sigma-Aldrich ®) de laboratorios Merck.

2.2.3. Equipos y varios:

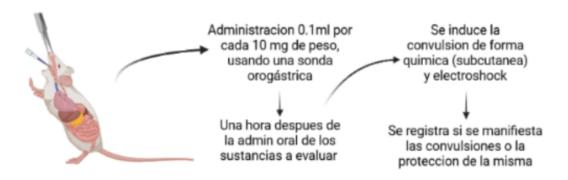
- Electroestimulador Coulbourn Instruments, A13-65
- Balanza analítica
- Cronómetro
- Rotarod
- Jeringas de 1 ml
- Sonda orogástrica para ratón
- Corrales de observación
- Agua destilada
- Polipropilenglicol
- Glicerina
- Polisorbato 80
- Cloruro de sodio 0.9%
- Gel de alta conductividad

Figura 2-2. Protocolo de suspensión de los cristales de cumarina.



Los tratamientos se administraron los tratamientos por vía oral con una cánula orogástrica, en volúmenes de 0,1 ml/10g de peso, en dosis según se ha descrito y se especifica en el aparte de diseño experimental.

Figura 2-3. Esquematización de la administración oral en ratones.



Fuente: Creado con Biorender.com.

2.3 Pruebas anticonvulsivantes:

Se utilizó una batería de 3 ensayos biológicos con el fin de determinar el perfil coadyuvante de la cumarina asociada a fármacos anticonvulsivantes bajo diferentes estímulos y una prueba de neurotoxicidad. Dichas pruebas fueron adaptadas según las directrices del Programa CYTED de evaluación de la actividad farmacológica de plantas medicinales (Lapa et al.,2002).

2.3.1 Prueba de neurotoxicidad

Con el fin de establecer si la cumarina (2H-cromen-2-ona) poseía efectos neurotóxicos en la dosis empleada y vía de administración, se implementó la prueba de *rotarod* o eje rodante, la cual está orientado a determinar de manera preliminar efectos sobre la coordinación motriz y equilibrio.

Esta prueba se realizó para determinar posibles efectos neurotóxicos agudos a nivel motor mediante la verificación de la capacidad motriz de los ratones previamente entrenados para mantener el equilibrio, durante al menos 30 seg, sobre un eje que gira a 10 rpm, (Escobar, 2016). Se registró el tiempo de permanencia sobre el mismo, comparado los tiempos de pre y post administración de las sustancias a evaluar. La prueba se llevó a cabo una hora después de administrar los tratamientos (fármaco antiepiléptico, cumarina y la combinación de los dos) (Lapa et al., 2002), una vez se verificó que no existía neurotoxicidad en los animales se dio el aval para iniciar los protocolos de convulsión. Se realizó la prueba en cada modelo para verificar el estado neuromotriz de los individuos tras la administración de los tratamientos.

Figura 2-4. Representación gráfica del protocolo de Rotarod.



Se pre-entrenan los animales a caminar sobre los tampones, la velocidad es ajustable iniciando desde 8 hasta 12 rpm, en cada velocidad el animal dura 60 seg. Se realiza ese acondicionamiento durante 2 dias con descansos para reducir el estres

Fuente: Creado con Biorender.com

2.3.2 Modelo de inducción de convulsión por electroshock de máxima intensidad (MES)

MES es un modelo útil para identificar agentes para el tratamiento de las crisis tónicas clónicas generalizadas. Se genera por la aplicación de una descarga eléctrica de 60 Hz de frecuencia y 50 mA de intensidad, durante un margen de tiempo de 200 a 300 ms, las cuales pueden variar según las condiciones locales de cada laboratorio. En el caso del Dpto. de Farmacia de la UNCSB, la aplicación de dos pulsos rectangulares de 8,3 ms de corriente alterna de 50 mA, es suficiente para generar la convulsión tónica - clónica. El estímulo se aplica vía corneal mediante electrodos (estimulador *Coulbourn Instruments*), previamente instilación de SSN y pasta conductora.

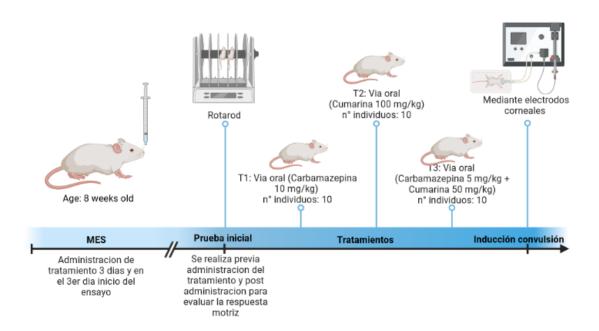


Figura 2-5. Esquema de implementación del modelo MES.

2.3.3 Modelo de inducción química de convulsión con pentilentetrazol (PTZ)

Esta prueba es útil para detectar agentes con potencial farmacológico para el tratamiento de las crisis de ausencia. Se utiliza pentilentetrazol (PTZ), un agente químico con efectos inhibitorios sobre GABA (Huang et al, 2002), que, en ausencia de un agente protector (FAE), induce sacudidas mioclónicas en cabeza, tronco o extremidades, generalmente precedidos de la extensión de la cola (fenómeno de *Straub*) (Giardina, 2001). PTZ se aplica en dosis que fluctúan según las condiciones locales de cada laboratorio. En el caso de esta investigación, se estableció en 70 mg/kg, sc, interauricular. El animal se observa durante 30 minutos y para considerarse protegido, no debe aparecer ninguna convulsión que dure más de 5 segundos.

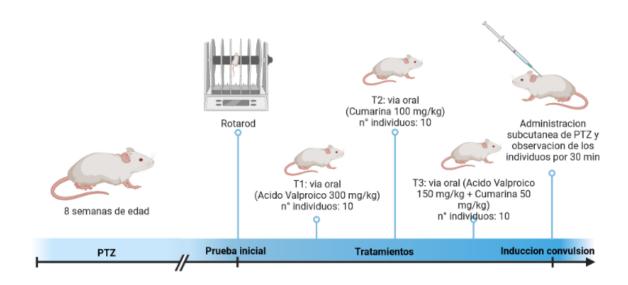


Figura 2-6. Esquema de implementación del modelo de PTZ.

2.3.4 Modelo de inducción de convulsión de baja intensidad y frecuencia

Esta prueba se implementa para identificar compuestos potencialmente útiles frente a las crisis refractarias (Barton et al., 2001). Se aplica una descarga de menor intensidad y frecuencia que la utilizada en el modelo MES, usualmente, pulsos de 6 Hz, 32 mA de corriente, y 3 segundos de duración, características tales generan movimientos oscilatorios lentos en cabeza, tronco o extremidades, movimientos de bigotes, extensión de la cola o inmovilidad ("freezing"), durante al menos 5 segundos. Para las condiciones de este trabajo, se estableció la aplicación de los estímulos eléctricos de 9 ciclos, 32 mA de corriente alterna, con pulsos de 10 ms y pausas inter-pulsos de 200 ms, según lo introducido previamente por Girón et al., 2009. Tras la convulsión, el animal recupera completamente la conducta exploratoria habitual (Barton et al., 2001).

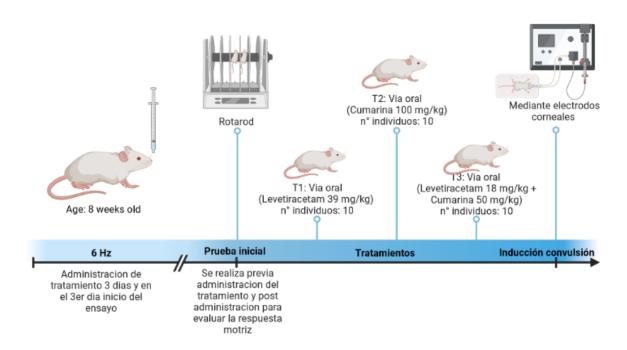


Figura 2-7. Esquema de implementación del modelo de 6 Hz.

2.4 Diseño experimental y análisis estadístico

La investigación se realizó en dos fases. En la fase 1 se estableció, en cada uno de los tres modelos de convulsión, el efecto de la cumarina sola (100 mg/kg, p.o.) (Bhat, 2011), los patrones solos (a la dosis efectiva 50 [DE_{so}], reportadas por la literatura), o la combinación de cumarina y cada uno de los patrones, administradas a la mitad de la dosis previamente descrita (50 mg/kg de cumarina y la mitad de la dosis de cada patrón o agente de referencia, ver adelante). Esto con el fin de examinar si la combinación administrada en dosis menores mantuvo o no el efecto protector conferido por el patrón cuando este se administró por aparte.

En la fase 2 se efectuó el análisis de sinergia, examinando un rango más amplio de dosis de los agentes en combinación. Para ello se escogió el modelo de convulsión umbral (baja intensidad y frecuencia), por ser el modelo de crisis refractaria, y, por ende, el de mayor reto en la investigación actual de farmacología y donde más aplicación tiene la administración de más de un agente anticonvulsivante (cumarina y levetiracetam).

2.4.1. Actividad anticonvulsivante

Fase 1: Evaluación de la combinación de cumarina con agentes de referencia:

Se destinaron 30 animales macho y 30 animales hembra para la fase 1, los cuales tuvieron un ciclo por todas las pruebas, entre cada prueba realizada se destinó una semana de descanso para los animales, en esta se evaluaron comportamiento y posibles alteraciones, de no presentarse variaciones en los animales se procedió a la siguiente prueba, se inició con: (1) Electroshock de baja intensidad, (2) Inducción química con PTZ y se finalizó con (3) Electroshock de alta intensidad.

Se administraron los siguientes esquemas de tratamientos, en grupos de 10 animales para cada sexo (hembras/machos): (1) Fármaco de elección, (2) Cumarina y (3) Combinación del fármaco y cumarina. Los animales se dosificaron diariamente por tres

días, efectuando la prueba de convulsión en el día 3, una hora tras la última dosificación por vía oral, se manejó un volumen de administración de 0,1 ml/10 g de peso.

Para la prueba de convulsión umbral inducida eléctricamente de baja intensidad (6 Hz) se aplicaron los siguientes tratamientos y dosis: (1) Cumarina, 100 mg/kg (Bhat, 2011), (2) Levetiracetam 36 mg/kg (Barton,2001) y (3), Cumarina/Levetiracetam 50/18 mg/kg, respectivamente (50% de las dosis previas).

Para la prueba de convulsión química inducida por PTZ se aplicaron los siguientes tratamientos y dosis: (1) Cumarina, 100 mg/kg (Bhat, 2011), (2) Ácido valproico 300 mg/kg (Giardina,2001) y (3), Cumarina/Ácido valproico 50/150 mg/kg, respectivamente (50% de las dosis previas).

Para la prueba de convulsión por electroshock se aplicaron los siguientes tratamientos y dosis: (1) Cumarina, 100 mg/kg (Bhat, 2011), (2) Carbamazepina 10 mg/kg (Giardina,2001) y (3), Cumarina/Carbamazepina 50/5 mg/kg, respectivamente (50% de las dosis previas).

La prueba de convulsión por electroshock se dejó al final del ciclo, dado el riesgo de que la fase tónica lleve a paro respiratorio y muerte. En todo caso, se conservó el tamaño de muestra fijado en 10 individuos por tratamiento para cada prueba, reemplazando los animales cuando fue necesario como: cuando se presentó broncoaspiración accidental tras la administración o paro respiratorio secundario a la convulsión experimental.

Sí bien este procedimiento de diseño secuencial introduce un sesgo metodológico, permite optimizar tanto el número de animales de laboratorio como la posibilidad de evaluar el efecto de los tratamientos en 3 modelos de convulsión.

Figura 2-8. Esquema del desarrollo de los modelos convulsivos con días de realización (Ensayo de 6 Hz y PTZ).

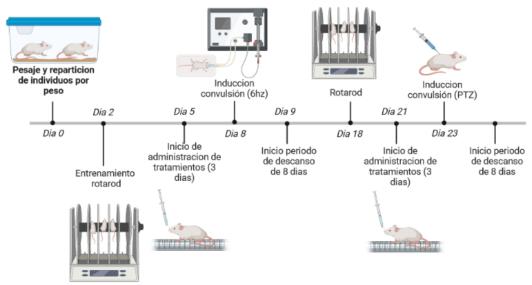
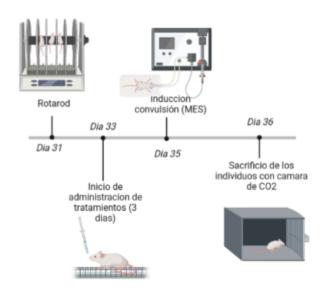


Figura 2-9. Esquema del desarrollo de los modelos convulsivos con días de realización (Ensayo de MES).



Fuente: Creado con Biorender.com

Fase 2: Evaluación de la actividad sinérgica de cumarina en el modelo de convulsión de baja intensidad y frecuencia

Dada la limitada disponibilidad de animales se seleccionó la prueba de convulsión umbral inducida eléctricamente (6 Hz), por ser modelo de crisis refractaria, para efectuar el análisis de posible sinergia entre cumarina y el referente para este tipo de trastornos, levetiracetam. En esta fase se pusieron a prueba varias combinaciones de cumarina y levetiracetam, para este se contó con un tamaño de muestra de 3 animales (hembras y machos) por cada combinación (n:3, total 75) como se puede identificar en la **tabla 2-1**.

La prueba se realizó con la administración de los tratamientos a cada individuo según indica la tabla 1, durante 3 días seguidos y aplicando el estímulo eléctrico de baja intensidad y frecuencia en el día 3.

En la segunda fase se realizó el ensayo de curva dosis-efecto, en el cual se buscó evaluar el efecto sinérgico entre la combinación de levetiracetam y cumarina bajo la inducción de convulsión en el modelo de baja frecuencia e intensidad 6 Hz. Se tomó la decisión de realizarlo con este modelo ya que proporciona datos de sinergia para pacientes con refractariedad o farmacorresistencia a los tratamientos tradicionales y monoterapia con FAE. Se tomaron 4 dosis de levetiracetam (9, 18, 36 y 72 mg/kg) y 4 dosis de cumarina (50, 100, 200, 300 mg/kg), estas se eligieron dentro de parámetros de no toxicidad para los individuos evaluados y con base en estudios previos en los cuales se observaron efectos de la cumarina desde 100 hasta 400 mg/kg, y de levetiracetam de 5 hasta 3000 mg/kg. Se tomaron estas 4 dosis para cada sustancia evaluada, con el fin de identificar la curva dosis-efecto, iniciando en dosis por debajo de la dosis efectiva 50 (DE50) con respeto a la dosis efectiva 90. El principal objetivo era hallar potencial sinérgico entre estos dos principios activos.

Tabla 2-1. Esquematización de la repartición de los tratamientos para el ensayo de sinergia entre levetiracetam y cumarina.

	LEVETIRACETAM						
С		0 mg/kg	9 mg/kg	18 mg/kg	36 mg/kg	72 mg/kg	
M	0 mg/kg	3	3	3	3	3	
A R	50 mg/kg	3	3	3	3	3	
ı	100 mg/kg	3	3	3	3	3	
N A	200 mg/kg	3	3	3	3	3	
	300 mg/kg	3	3	3	3	3	Total
		15	15	15	15	15	75

2.4.2. Distribución de los individuos en los ensayos realizados:

Para el desarrollo de los ensayos se llevó a cabo un diseño estadístico al azar, con el fin de tener todos los tratamientos en el mismo espacio. Adicional, se distribuyeron según su peso y sexo (hembras/machos) por separado, por lo que cada caja tuvo un número máximo de 10 hembras y 6 machos, para evitar mezclarlos se realizaron primero los ensayos en hembras y posterior con los machos. Por último, se asignó de manera aleatoriamente los tratamientos para caja.

Figura 2-10. Representación esquemática de la distribución de los animales usados en el ensayo farmacológico.



2.5 Análisis estadístico:

Los datos se expresan como el número de animales protegidos y no protegidos y la fracción o porcentaje protección (con su respectivo valor de confianza). En la fase1, para establecer el efecto de los tratamientos, considerando el factor sexo (machos y hembras) y el factor tratamiento (agente de referencia, cumarina y combinación), se efectuó un análisis de varianza bifactorial, más la prueba de diferencias de *Dunnet*, asignando un valor de 0 a la convulsión y 1 a la protección con un nivel de significancia del 95% (p<0.05). Todas estas pruebas se efectuaron con el programa *GraphPad-6*®.

Para el análisis de sinergia (fase 2) se utilizó el modelo de Loewe, utilizando la herramienta *Combenefit*[®] que permite establecer el carácter aditivo, sinérgico o inhibitorio de la interacción en el rango de dosis aplicado.

2.6 Consideraciones éticas:

Esta investigación se efectuó acorde con los protocolos éticos, legales y ambientales de la experimentación con animales, considerando que la pregunta de investigación amerita los experimentos propuestos en este proyecto, llamando la atención de no contar aún con pruebas alternativas sustitutivas satisfactorias que prescinda del animal de laboratorio.

5 6

La investigación se desarrolló a cabo bajo el principio de minimización de dolor y malestar del animal y se contemplando el cumplimiento de las 5 libertades de los animales: (1) no padecer ni hambre ni sed, malestar físico, (2) reducir la presentación de dolor injustificado, (3) prevenir enfermedades, (4) permitir el desarrollo del comportamiento dentro del ambiento de investigación y (5) reducir el miedo o angustia del animal, considerando su condición de animales experimentales. Dichos parámetros se encuentran establecidos en la Ley 84 de 1989 "Estatuto Nacional de Protección de los Animales", cuyo Capítulo VI hace referencia al uso de animales en experimentación e investigación, la cual determina la importancia de brindar a los animales de laboratorio condiciones de vida apropiada, de bienestar y salud dentro de los aspectos básicos para evitar cualquier tipo de sufrimiento innecesario en los animales y en la resolución 8430 de 1993 "Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud" (Congreso de la República, 2012). Adicionalmente, se tuvo en cuenta la resolución n° 2935 de octubre del 2001 del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural - ICA, en la cual se establecen los procedimientos de bioseguridad en investigación y control de calidad de reactivos biológicos. De igual manera se siguieron los protocolos y normas establecidas por el Bioterio de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia (Anexo A: aval de comité de bioética, Acta No. 04 de 2022).

Existe un inevitable costo ético en esta investigación, resultado de la necesaria inducción de convulsiones experimentales en el ratón de laboratorio, costo que se intentó reducir al máximo con un apropiado diseño metodológico, en el que se optimizó el número de animales utilizados, garantizando poner punto final al ensayo cuando el deterioro de los animales sobrepasó las expectativas esperadas y aplicando con sumo cuidado las técnicas a evaluar.

3. Resultados

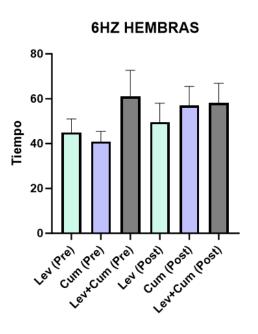
3.1 Neurotoxicidad evaluada con la prueba de eje rodante

En la prueba de eje rodante se midió el equilibrio del ratón, con el fin de detectar posibles efectos secundarios de los fármacos evaluados en la investigación, esta se realizó con una fase de adaptación y previo entrenamiento de los individuos.

Posteriormente, se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la actividad motora de los ratones en los tres modelos implementados. Se inició la prueba en la hora 0 de administración (pre – administración), se tuvo en cuenta el tiempo de permanencia del animal en el eje, luego se administraron los tratamientos y transcurrido el tiempo de una hora se evaluaron los tres tratamientos, donde no se observaron variaciones significativas entre el patrón de cada modelo (levetiracetam, carbamazepina y ácido valproico), cumarina sola y la combinación. Se evaluó que el comportamiento fue similar entre los tres tratamientos administrados.

Como se puede observar en las **figuras 3-1, 3-2 y 3-3**, la media de los tiempos de permanencia fueron entre 30 y 60 seg., para los tres modelos y en los sexos evaluados (hembra y macho).

Figura 3-1. Tiempo de permanencia sobre el eje rodante (rotarod) pre y postadministración de levetiracetam (36 mg/kg, v.o.), cumarina (100 mg/kg, v.o.) y la combinación levetiracetam (18 mg/kg, v.o.) /cumarina (50mg/kg, v.o.) en ratones macho y hembra CD-1.



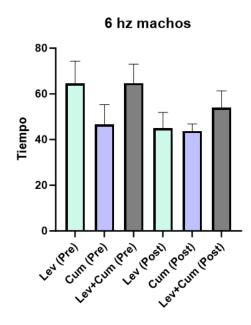
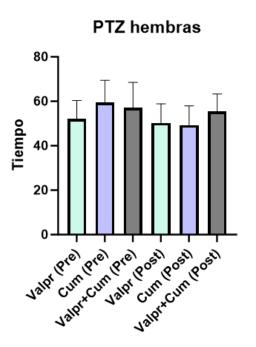


Figura 3-2. Tiempo de mantenimiento sobre el eje rodante (rotarod) pre y post-administración de ácido valproico (300 mg/kg, v.o.), cumarina (100 mg/kg, v.o.) y la combinación ácido valproico (150 mg/kg, v.o.) /cumarina (50mg/kg, v.o.) en ratones macho y hembra CD-1.



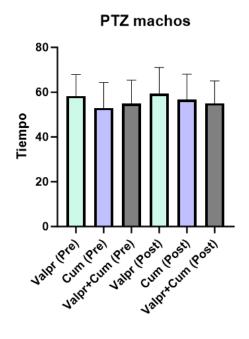
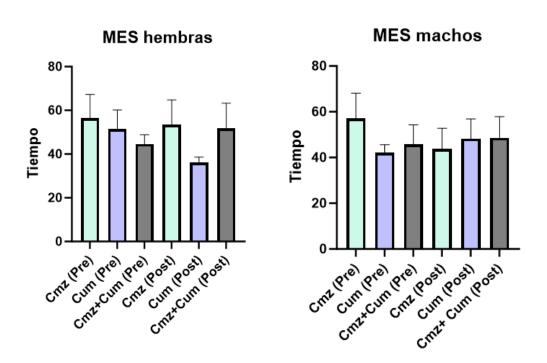


Figura 3-3. Tiempo de mantenimiento sobre el eje rodante (rotarod) pre y postadministración de carbamazepina (10 mg/kg, v.o.), cumarina (100 mg/kg, v.o.) y la combinación carbamazepina (5 mg/kg, v.o.) /cumarina (50mg/kg, v.o.) en ratones macho y hembra CD-1.



3.2 Ensayos de convulsión inducida

Los resultados de los 3 modelos realizados en hembras y machos se muestran en la **tabla 3-1**. En esta se exponen los modelos convulsivos realizados y los tratamientos administrados, con el fin de identificar diferencias entre ellos: (i) patrón para cada modelo en monoterapia, (ii) cumarina como monoterapia y (iii) la combinación del patrón y cumarina.

Continuando con la **tabla 3-1**, se pueden observar los resultados de prevención de convulsiones. En dicha tabla se presentan los tres modelos implementados, para cada uno se muestran los tratamientos administrados con la dosis respectiva. También se puede evidenciar las columnas de "proteccion" para cada sexo (hembra/macho)

implementado en la investigación, en estas se consignan los individuos que no presentaron convulsión con respecto al número de individuos total.

Tabla 3-1. Actividad anticonvulsivante de los tratamientos administrados (fármaco de referencia, cumarina y combinación) para cada uno de los modelos desarrollados.

Prueba	Tratamiento	Dosis	Protección (hembras)	Protección (machos)
	Levetiracetam	36 mg/kg	5/10	5/10
Descarga eléctrica de 6	Cumarina	100 mg/kg	2/10	4/10
Hz	Levetiracetam + cumarina	18 mg/kg 50 mg/kg	3/10	3/10
Pentilentetrazol	Acido valproico	300 mg/kg	6/10	7/10
	Cumarina	100 mg/kg	0/10	5/10
	Acido valproico + Cumarina	150 mg/kg 50 mg/ kg	3/10	6/10
Electroshock de	Carbamazepina	10 mg/kg	4/10	6/10
alta intensidad (MES)	Cumarina	100 mg/kg	2/10	6/10
	Carbamazepina + Cumarina	5 mg/kg 50 mg/kg	4/10	7/10

Los resultados de la segunda fase de la investigación se consignaron en la **tabla 3-2**, en este ensayo se evaluó el posible efecto sinérgico entre la cumarina y el patrón que para este modelo fue levetiracetam. En esta tabla se presentan los resultados de prevención de convulsiones en el modelo de baja frecuencia e intensidad. En dicha tabla se puede observar el número de individuos protegidos para cada dosis implementada comparada con el número de individuos totales para cada prueba.

Tabla 3-2. Resultados de dosis combinadas de levetiracetam y cumarina en el modelo de convulsión de 6 Hz en ratones (número de individuos evaluados versus número de individuos protegidos).

	LEVETIRACETAM							
С		0 mg/kg	9 mg/kg	18 mg/kg	36 mg/kg	72 mg/kg		
M	0 mg/kg	0/3	2/3	1/3	2/3	1/3		
A R	50 mg/kg	2/3	1/3	0/3*	1/3	3/3		
ı	100 mg/kg	1/3	3/3	3/3	1/3	0/3*		
N A	200 mg/kg	3/3	2/3	2/3	2/3	3/3		
	300 mg/kg	2/3	2/3	3/3	1/3	3/3		

Para determinar un posible efecto sinérgico en la combinación se tabularon los datos en el programa *Combenefit*, resultados que se especifican más adelante.

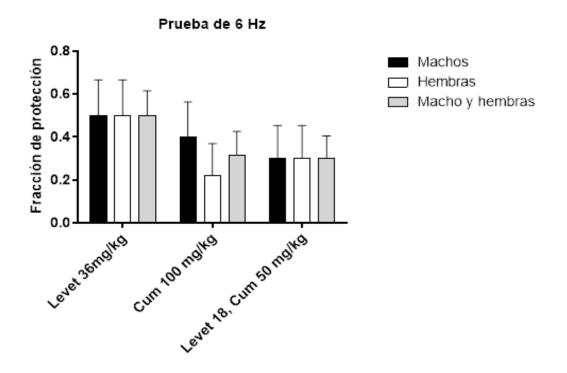
3.2.1 Modelo de inducción convulsivo de baja intensidad y frecuencia:

Mediante este modelo se evaluaron los efectos de los tres tratamientos: levetiracetam como patrón, cumarina y la combinación de estos dos. Los resultados obtenidos se

encuentran en la **figura 3-1**, en la que se observa en el eje Y la fracción de protección de los tratamientos y en el eje X los tratamientos administrados.

Se observa que levetiracetam, a dosis de 36 mg/kg v.o., tuvo un porcentaje de protección de la mitad de la población evaluada. Esta protección es numéricamente superior a la conferida tanto por cumarina, 100 mg/kg v.o., y la combinación de los mismos, a la mitad de sus dosis (18 y 50 mg/kg v.o., respectivamente), sin que se alcance significancia estadística. Adicionalmente no se observó una variación entre sexos, si bien, la protección por cumarina en hembras fue numéricamente menor.

Figura 3-4. Fracción de protección obtenida con levetiracetam (36 mg/kg, v.o.), cumarina (100 mg/kg, v.o.) y la combinación levetiracetam (18 mg/kg, v.o.) /cumarina (50mg/kg, v.o.) en el modelo de convulsión eléctrica umbral de 6 Hz en ratones macho y hembra CD-1.

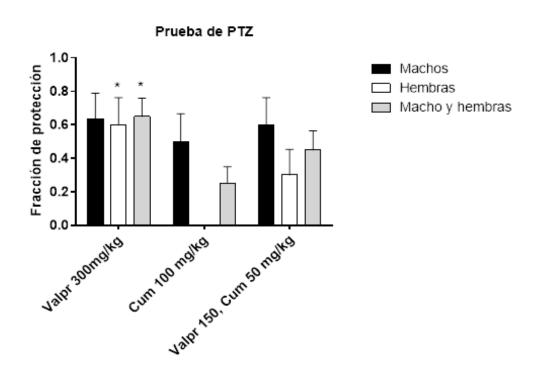


3.2.2 Modelo convulsivo de inducción química por PTZ:

En la **figura 3-2** se encuentran los datos obtenidos en el modelo de convulsión inducida de manera química con PTZ. En la figura se muestra en el eje Y la fracción de protección y en el eje X los tratamientos implementados, también se muestra mediante barras los resultados obtenidos para hembras, machos y mixtos.

Cumarina en solitario, no presentó un efecto protector en hembras, pero sí, parcialmente, en machos. Ácido valproico protege a la mayoría de los individuos (70 y 60%, machos y hembras, respectivamente). La combinación de cumarina y patrón (ácido valproico), protege en menor porcentaje a los individuos (60 y 30%, machos y hembras, respectivamente).

Figura 3-5. Fracción de protección obtenida con ácido valproico (300 mg/kg, v.o.), cumarina (100 mg/kg, v.o.) y la combinación ácido valproico (150 mg/kg, v.o.) /cumarina (50mg/kg, v.o.) en el modelo de convulsión de inducción química con PTZ en ratones macho y hembra CD-1.

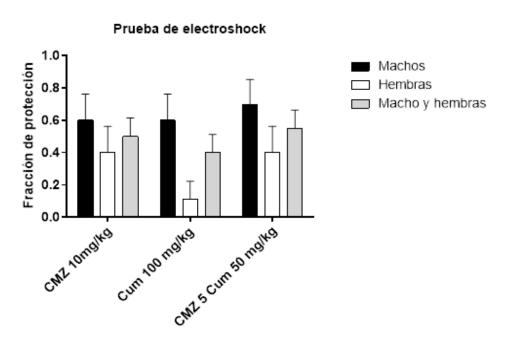


3.2.3 Modelo convulsión de electroshock de máxima intensidad (MES):

El último ensayo realizado fue el modelo de inducción de convulsiones de electroshock de alta intensidad (MES). Los resultados se pueden observar en la **figura 3-3**, al igual que en los anteriores modelos el eje Y representa la fracción de protección de convulsión y el eje X los tratamientos evaluados.

En estos resultados se puede evidenciar que el patrón (carbamazepina) tuvo una protección de más de la mitad de los individuos, en los demás tratamientos se encontró que cumarina en solitario tuvo un desempeño similar que el carbamazepina sola y para el tratamiento de la combinación de cumarina y patrón tuvieron un mejor desempeño que el patrón, estos resultados para el modelo realizado en machos, para el caso del ensayo en hembras el resultado fue menor que en los machos para los tres tratamientos.

Figura 3-6. Fracción de protección obtenida con carbamazepina (10 mg/kg, v.o.), cumarina (100 mg/kg, v.o.) y la combinación carbamazepina (5 mg/kg, v.o.) /cumarina (50mg/kg, v.o.) en el modelo de convulsión de electroshock de máxima intensidad (MES) en ratones macho y hembra CD-1.



3.2.4. Test de sinergia entre levetiracetam y cumarina

6

El resultado se analizó mediante el programa *Combenefit*®, bajo el esquema del modelo Loewe (ver anexo B: modelo de aditividad de Loewe). En la **figura 3-4**, se muestran las diferentes dosis de levetiracetam y cumarina, en la figura se puede observar el porcentaje de sinergismo entre estas dos sustancias evaluadas. Representado en azul, los tratamientos que tiene efecto sinérgico; así como también se representa en color verde la actividad individual de las sustancias y en rojo a las dosis que resultaron en antagonismo.

De esta información se puede extraer la presencia de recuadros en color azul que indican la actividad sinérgica de las sustancias evaluadas, dentro del recuadro también se encuentran valores en números que representan el puntaje que se le asignó con respeto a su potencial sinérgico siendo el número más alto y por consiguiente la dosis con mayor potencial la de levetiracetam 9 mg/kg y cumarina 100 mg/kg, puesto que presenta un puntaje de 52% de actividad sinérgica y una significancia marcada con la presencia de las 3 estrellas en esta por el número de réplicas en las cuales fue positiva la actividad de las sustancias. Adicionalmente, las demás casillas en la misma coloración tuvieron un puntaje entre 48-51% y también una significancia para el estudio de sinergia y que las sustancias mejoran su rendimiento en administración simultánea.

Las casillas que se encuentran en color verde indican que en estas dosis no se encuentra antagonismo ni tampoco sinergismo, se diría que en este caso las sustancias están trabajando de forma independiente sobre la condición que se quiere evaluar, entendiendo este efecto como aditivo, en el cual el efecto se suma entre las sustancias pero no interactúan entre sí.

Es importante detallar que en la **figura 3-5**, se representa las diferentes concentraciones de levetiracetam y cumarina; en este caso se muestran como puntos con alturas diferentes que indican el porcentaje de sinergia. En el caso de los puntos que se encuentran por encima de 0 muestran efecto sinérgico, mientras que los que están debajo del 0 es un indicativo de antagonismo. Los puntos que se encuentran sobre el plano 0 indican la existencia de aditividad.

Figura 3-7. Matriz generada por *Combenefit* empleando el modelo de Loewe. Representación gráfica de las interacciones de sinergismo y antagonismo entre levetiracetam y cumarina en el modelo de 6 Hz en ratones de laboratorio. Donde la significancia estadística se muestra: *** p <0.001; ** p < 0.01 y * p < 0.05

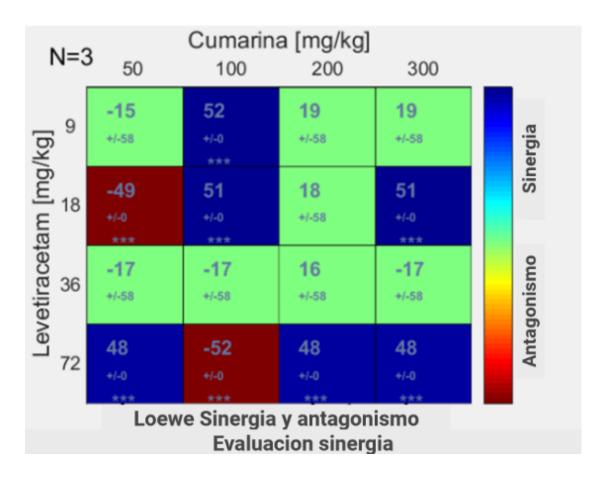
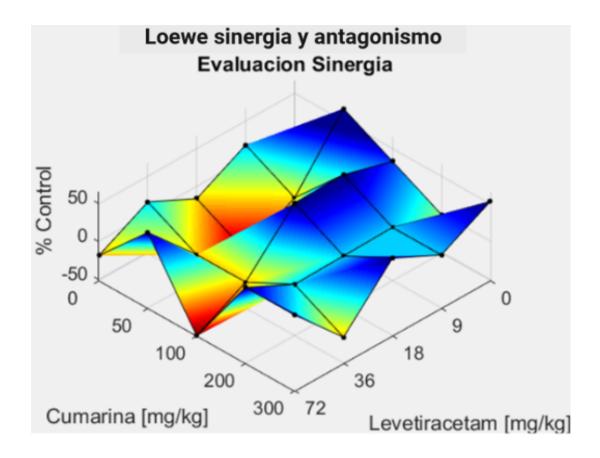


Figura 3-8. Mapa de superficie generado por *Combenefit* empleando el modelo de Loewe. Representando la interacción de sinergismo y antagonismo entre levetiracetam y cumarina en el modelo de 6 Hz en ratones de laboratorio.



4. Discusión:

En esta investigación se buscó evaluar la potencial actividad de cumarina como coadyuvante, utilizando en combinación con fármacos anticonvulsivantes de primera línea en el tratamiento de las crisis tónicas clónicas generalizadas, las crisis de ausencia y las crisis refractarias, utilizando los modelos de convulsión en ratones de laboratorio: electroshock (MES), pentilentetrazol (PTZ) y descargas eléctrica umbral o de baja frecuencia así como los eventuales efectos neurotóxicos agudos de las dosis aplicadas.

La primera prueba evaluada fue la de eje rodante (rotarod), como prueba de neurotoxicidad aguda, la cual no evidenció efecto depresor a las dosis evaluadas (100 mg/kg cumarina sola o 50 mg/kg de cumarina en combinación) destacando que, en un estudio previo, se encontraron efectos depresores con cumarina a partir de dosis de 120 mg/kg (Ariza et al., 2006). Adicionalmente se reportan estudios de seguridad de cumarina en ratas, en donde se identificaron cambios orgánicos principalmente en hígado y formación de tumoraciones en tratamientos crónicos, en tratamientos que superan los límites tolerados para los animales, en dicho estudio se establecieron dosis sin efectos tóxicos (42 mg/kg/día en machos y 16 mg/kg en hembras). Por último, en ratones, no se ha encontrado formación de tumoraciones en casos crónicos, pero si se conocen dosis que pueden inducir hepatotoxicidad, pero no se han determinado otras alteraciones (26 a 280 mg/kg en machos y 28 a 271 mg/kg en hembras) (Carlton et al., 1996; Lago, 1999; Felter et al., 2006).

Los experimentos realizados apuntan hacia una mayor actividad de cumarina en las convulsiones inducidas por electroshock (MES), y por ende, su potencial utilidad en el

campo de las crisis primariamente tónicas clónicas generalizadas, confirmando hallazgos previos, cuando se aisló a cumarina como metabolito activo de la especie *Hygrophila tyttha* (Ariza et al., 2007). Considerando que el índice de protección tiende a incrementarse cuando se utiliza en combinación con el agente de referencia carbamazepina (CMZ) a la mitad de las dosis de los agentes por separado (50 mg/kg de cumarina y 5 mg/kg de CMZ en combinación versus 100 y 10 mg/kg de estos por separado), cabe plantear que cumarina podría desempeñar un papel como coadyuvante en este tipo de crisis.

La prevención de las convulsiones tónicas clónicas por cumarina, a su vez pueden ser un indicador de neuroprotección, entre otras razones, porque la prolongada fase tónica de la convulsión experimental puede llevar a paro respiratorio y muerte del animal. En consonancia con este planteamiento, otros autores han descrito efectos neuroprotectores de cumarina a dosis de 100 mg/kg (Muke et al., 2018). Otros agentes derivados cumarínicos, han mostrado potencial frente al modelo convulsiones de electroshock de alta intensidad (MES), mediante el aumento de la supervivencia en las muestras evaluadas (Annunziata et al., 2020), por lo anteriormente dicho, se sugiere un potencial mecanismo de acción, mediante la inhibición de canales de sodio dependientes de voltaje (Tasso et al., 2004), antes que interacciones de otro tipo, como facilitación de GABA o antagonismo de canales de calcio, más vinculadas éstas con las crisis de ausencia (Singhuber et al.2011).

Los datos muestran que la protección conferida por cumarina en el modelo de PTZ es menor que el encontrado en MES, por lo que el compuesto tendría menor utilidad en las crisis de ausencia y las crisis mioclónicas. No obstante, se observa que cuando se administra en combinación con el agente de referencia, ácido valproico (también a la mitad de las dosis de los agentes por separado), el índice o fracción de protección tiende a aproximarse al conferido por ácido valproico cuando éste se utiliza a las dosis de 300 mg/kg, por lo que no se descarta de plano alguna utilidad en este tipo de crisis en el campo de coadyuvancia.

Llama también la respuesta diferencial según el sexo, observando una menor respuesta protectora en las hembras, no solo con cumarina (aunque esta es más notoria, frente a

PTZ), sino con todos los agentes de referencia examinados, por lo que el umbral parece ser diferente, según el sexo. Este hallazgo se correlaciona con lo encontrado por otros autores, quienes también han señalado una respuesta convulsiva diferencial según el sexo (Scharfman et al., 2014; Matovu et al., 2022).

Para el caso de la convulsión umbral o de baja frecuencia, modelo de crisis refractarias, parece observarse una respuesta más discreta alcanzada con cumarina, administrada sola o en combinación, pero posiblemente por el pequeño tamaño de la muestra utilizada, no se logra detectar con claridad el efecto. Dada la importancia que las crisis refractarias tienen actualmente como reto en farmacoterapia, se decidió, de todas maneras, escoger este modelo para el análisis de sinergia, haciendo uso de la plataforma *Combenefit* (Di Veroli et al., 2016), de libre acceso. Los resultados no son concluyentes, parece haber una zona de posible sinergia en el rango de dosis mayores cuando se utiliza la combinación de cumarina/levetiracetam, pero el tamaño de muestra por cada combinación, tratándose de un experimento in vivo ha resultado demasiado pequeño para proponer una interacción de este tipo.

Entre las limitaciones de este estudio cabe señalar la relativa escasa disponibilidad de animales de laboratorio, considerando la inevitable variabilidad interindividual en los experimentos in vivo, el carácter categórico de la respuesta observada, la variabilidad debida al sexo y el sesgo que conlleva la exposición repetida del animal de laboratorio a diferentes estímulos convulsivantes (a la que se acudió en el diseño experimental para optimizar el tamaño de la muestra). Futuros ensayos habrán de tener que superar estas limitantes para perfilar mejor el eventual aporte que proporcione cumarina en el campo de la adyuvancia en la farmacoterapia de la epilepsia.

5. Conclusiones recomendaciones

У

5.1 Conclusiones

Los resultados de este estudio apuntan hacia un efecto protector de cumarina en las convulsiones inducidas por electroshock (MES), modelo de las crisis tónicas clónicas generalizadas, dando soporte a hallazgos previos y permitiendo plantear que cumarina podría ejercer un efecto coadyuvante en el manejo de este tipo de crisis.

En el caso de las convulsiones inducidas por PTZ, modelo de las crisis de ausencia y crisis mioclónicas y las convulsiones inducidas por estímulo eléctrico de baja frecuencia, modelo de crisis refractarias, el efecto de cumarina parece ser menos pronunciado.

No hay elementos para proponer el uso de cumarina en combinación, por eventuales efectos de tipo sinérgico, en las crisis refractarias.

Hay una respuesta diferencial en relación con el sexo, en donde las hembras tienden a mostrar una mayor vulnerabilidad a la convulsión.

Se requieren experimentos adicionales con mayor tamaño de muestra para cuantificar posibles efectos sinérgicos de cumarina en los diferentes modelos de convulsión. Puesto que una de las limitaciones fueron el número de animales para uso en los ensayos.

En el rango de dosis aplicada en este estudio, la cumarina estaría desprovista de efectos neurotóxicos agudos.

5.2 Recomendaciones

- Se recomienda evaluar el potencial de sinergia de cumarina en el modelo de electroshock de alta intensidad (MES) con fines de complementar la información de sinergia en modelos adicionales.
- Se recomienda efectuar pruebas in vitro dirigidas a comprobar el posible mecanismo antagonista en los canales de sodio dependientes de voltaje, puesto que en los resultados del modelo de electroshock de alta intensidad fueron destacables..

Anexo A: Aval Comité de ética

FACULTAD DE CIENCIAS COMITÉ DE ÉTICA



Bogotá, abril 05 de 2022

Profesor(a)

Mario Francisco Guerrero Pabón

Departamento de Farmacia

Respetado(a) Profesor(a):

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 04 de abril de 2022 (Acta 04-2022), evaluó aspectos éticos del proyecto presentado por usted. Como resultado de esta revisión, el Comité considera que el proyecto *cumple* con los aspectos éticos básicos. Para los fines pertinentes, se transcriben las observaciones y el concepto final.

Proyecto / Investigadores - Grupos - Dependencias / Observaciones.

Proyecto 2. Evaluación del efecto coadyuvante de 2H-cromen-2-ona para la prevención de convulsiones inducidas experimentalmente en ratones de laboratorio.

Responsables. Ángela Viviana Núñez Medina (Tesista de Maestría en Ciencias –Farmacología) y Mario Francisco Guerrero Pabón (Director de Tesis, Grupo FARMOL).

Objetivo del estudio. Evaluar el efecto coadyuvante de 2H-cromen-2-ona para la prevención de convulsiones inducidas experimentalmente en ratones de laboratorio.

Los principales **aspectos éticos**, **legales y ambientales** a tener en cuenta por los investigadores están relacionados con:

1.Protocolos de bioseguridad. Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y sistema institucional de gestión ambiental - SGA (disposición de residuos químicos y biológicos). El acceso a espacios físicos del campus UNAL deberá acogerse a protocolos de bioseguridad ajustados por la coyuntura actual de la pandemia por COVID-19.

2.Guías y pautas normativas.

Los investigadores declaran: "Para el desarrollo de la investigación se busca que sea bajo los protocolos éticos, legales y ambientales de la experimentación con animales, siendo esta una parte importante para resolver problemas que se han planteado en los ámbitos clínicos y no existe otra alternativa. La investigación se lleva bajo el principio de la mimización de dolor y angustia del animal, se contempla el cumplimiento de las 5 libertades de los animales: no padecer ni hambre ni sed, malestar físico y reducir la presentación de dolor injustificado, control de enfermedades, permitir el desarrollo del comportamiento dentro del ambiente de investigación y reducir el miedo o angustia del animal (considerando su condición de los animales experimentales).

Hay un inevitable costo ético en los procedimientos contemplados en esta investigación, por la lesión que resulta sobre el sistema nervioso central del animal tras la inducción de la convulsión experimental. Es un costo razonable, considerando que no se cuenta con alternativas válidas que reemplacen a entera satisfacción los modelos propuestos y por el beneficio que representa avanzar en el conocimiento de nuevas alternativas y aproximaciones terapéuticas en un trastorno que tiene alto impacto en salud pública. Se reducirá al mínimo ese daño, empleando un número limitado de animales, manipulándolos en todo momento con sumo cuidado considerando un punto final anticipado si la lesión provocada sobrepasa los limites esperados y sacrificándose humanamente, finalizado el experimento".

FACULTAD DE CIENCIAS COMITÉ DE ÉTICA



3.Propiedad intelectual (protección de los desarrollos y cumplimiento de normativas). Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional de Colombia (Reglamento sobre Propiedad Intelectual UNAL) y Resolución RG 032 de 2012 - Rectoría UN (Propiedad Intelectual en proyectos de Extensión UNAL).

Concepto: Proyecto Avalado. La vigencia del presente aval será la correspondiente al cronograma presentado en la propuesta de investigación.

El CEI tuvo acceso a los siguientes documentos: Proyecto de Investigación conteniendo las consideraciones éticas.

Luis Fernando Ospina Giraldo

Coordinador Comité de Ética (*)

(*) Acto Administrativo. Resolución No. 023 de 2020 (Acta 08 del 16 de abril de 2020, Secretaría Facultad de Ciencias) "Por la cual se actualiza la acreditación de los integrantes que conforman el Comité Permanente de Ética de la Facultad de Ciencias de la Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia para el período institucional, comprendido entre el 19 de abril del año 2020 y el 19 de abril del año 2022".

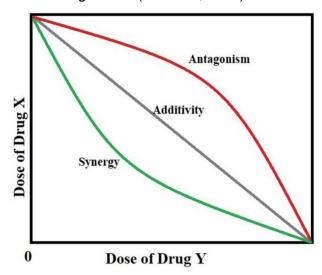
Anexo B: Modelo de aditividad de Loewe.

Para la formulación del modelo de aditividad de Loewe. Se debe tomar la dosis del fármaco $1 = y_1$ y la dosis del fármaco $2 = y_2$. Como se indica en la ecuación Y_1 es la dosis del fármaco 1 y Y_2 es el fármaco 2. El argumento que manejó el modelo es: si las dosis individuales dan una respuesta óptima, entonces al reducir la dosis y usarse en combinación debe generar el mismo resultado o mejor, de lo contrario no hay interacción y gráficamente se representaría en una línea recta (Ma et al., 2019).

Figura B-1. Ecuación del modelo de aditividad de Loewe (Ma et al., 2019).

$$\frac{y_1}{Y_1} + \frac{y_2}{Y_2} = 1$$

Figura B-2. Representación gráfica de la comparación de aditividad, sinergia y antagonismo (Ma et al., 2019).



Anexo C: Imágenes del desarrollo de la investigación.

Figura C-1. Secuencia de imágenes del proceso de inducción de convulsión en el modelo de baja frecuencia en un ratón. En el que se evidencia que los miembros posteriores están extendidos y separados, también el fenómeno de extensión de la cola (Straub-tail) y la inmovilidad.





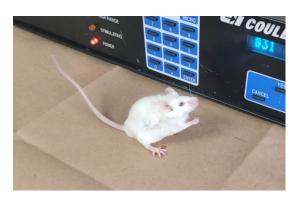






Figura C-2. Prueba de rotarod

Figura C-3. Fase Tónica de una convulsión generalizada (Pavel et al., 2006).





Convulsión inducida por el estímulo de MES: una fase breve tónica, la cual se identificó por la extensión de las extremidades, seguida de la fase de extensión tónica generalizada en la cual el animal quedó en rigidez, luego aparece la fase de movimientos clónicos de las extremidades, como se puede observar en la **figura C-3**. En el caso de no presentarse la convulsión se consideró protegido el animal, ya que se identificó la aparición de la extensión de las extremidades posteriores (Castel-Branco et al., 2009).

El protocolo se puede implementar intraperitoneal u oral como dosificación de los fármacos estudiados, dependiendo de la vía de administración se ajustan los tiempos de absorción entre 30 a 60 min.

Figura C-4. Secuencia de imágenes del proceso de inducción de convulsión en el modelo de MES en un ratón.





Anexo D: Estadística de datos.

Tabla D-1. Tabulación de datos de resultados del modelo de baja intensidad y frecuencia.

	2way ANOVA Tabular results					
1	Table Analyzed	Two-way ANOVA , not RM				
2						
3	Two-way ANOVA	Ordinary				
4	Alpha	0.05				
5						
6	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
7	Interaction	0.3682	0.9807	ns	No	
8	Tratamiento	3.249	0.1627	ns	No	
9	Genero	0.1875	0.8990	ns	No	
10						
11	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
12	Interaction	0.1016	4	0.02540	F (4, 109) = 0.1046	P = 0.9807
13	Tratamiento	0.8966	2	0.4483	F (2, 109) = 1.847	P = 0.1627
14	Genero	0.05175	2	0.02587	F (2, 109) = 0.1066	P = 0.8990
15	Residual	26.46	109	0.2428		
16						
17	Number of missing values	62				

Tabla D-2. Comparación de resultados entre los diferentes tratamientos y sexos implementados en el modelo de baja intensidad y frecuencia.

	2way ANOVA		Т	Т
	Multiple comparisons			
1	Within each column, compare rows (simple effects within columns)			
2				
3	Number of families	3		
4	Number of comparisons per family	2		
5	Alpha	0.05		
6				
7	Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
8				
9	Machos			
10	Levet 36mg/kg vs. Cum 100 mg/kg	0.1000	-0.3938 to 0.5938	No
11	Levet 36mg/kg vs. Levet 18, Cum 50 mg/kg	0.2000	-0.2938 to 0.6938	No
12				
13	Hembras			
14	Levet 36mg/kg vs. Cum 100 mg/kg	0.2778	-0.2296 to 0.7851	No
15	Levet 36mg/kg vs. Levet 18, Cum 50 mg/kg	0.2000	-0.2938 to 0.6938	No
16				
17	Macho y hembras			
18	Levet 36mg/kg vs. Cum 100 mg/kg	0.1842	-0.1695 to 0.5380	No
19	Levet 36mg/kg vs. Levet 18, Cum 50 mg/kg	0.2000	-0.1492 to 0.5492	No
20				
21				
22	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.
23				
24	Machos			
25	Levet 36mg/kg vs. Cum 100 mg/kg	0.5000	0.4000	0.1000
26	Levet 36mg/kg vs. Levet 18, Cum 50 mg/kg	0.5000	0.3000	0.2000
27				
28	Hembras			
29	Levet 36mg/kg vs. Cum 100 mg/kg	0.5000	0.2222	0.2778
30	Levet 36mg/kg vs. Levet 18, Cum 50 mg/kg	0.5000	0.3000	0.2000
31				
32	Macho y hembras			
33	Levet 36mg/kg vs. Cum 100 mg/kg	0.5000	0.3158	0.1842
34	Levet 36mg/kg vs. Levet 18, Cum 50 mg/kg	0.5000	0.3000	0.2000

Tabla D-3. Resumen de tabulación de resultados del modelo de baja intensidad y frecuencia

		1			
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7	Summary				
8					
9					
10	ns				
11	ns				
12					
13					
14	ns				
15	ns				
16					
17					
18	ns				
19	ns				
20					
21					
22	SE of diff.	N1	N2	q	DF
23					
24					
25	0.2203	10	10	0.4538	109
26	0.2203	10	10	0.9077	109
27					
28					
29	0.2264	10	9	1.227	109
30	0.2203	10	10	0.9077	109
31		1			
32		1			
33	0.1578	20	19	1.167	109
34	0.1558	20	20	1.284	109

Tabla D-4. Tabulación de resultados del modelo de inducción química de convulsiones con PTZ.

	2way ANOVA Tabular results					
1	Table Analyzed	Two-way ANOVA, not RM				
2						
3	Two-way ANOVA	Ordinary				
4	Alpha	0.05				
5						
6	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
7	Interaction	1.886	0.6443	ns	No	
8	Tratamiento	8.801	0.0038	**	Yes	
9	Genero	3.966	0.0761	ns	No	
10						
11	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
12	Interaction	0.5641	4	0.1410	F (4, 112) = 0.6269	P = 0.6443
13	Tratamiento	2.632	2	1.316	F (2, 112) = 5.849	P = 0.0038
14	Genero	1.186	2	0.5930	F (2, 112) = 2.636	P = 0.0761
15	Residual	25.20	112	0.2250		
16						
17	Number of missing values	59				

Tabla D-5. Comparación de resultados entre los diferentes tratamientos y sexos implementados en el modelo de inducción química con PTZ.

	2way ANOVA			
	Multiple comparisons			
1	Within each column, compare rows (simple effects within columns)			
2	. , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,			
3	Number of families	3		
4	Number of comparisons per family	2		
5	Alpha	0.05		
6				
7	Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
8				
9	Machos			
10	Valpr 300mg/kg vs. Cum 100 mg/kg	0.1364	-0.3279 to 0.6007	No
11	Valpr 300mg/kg vs. Valpr 150, Cum 50 mg/kg	0.03636	-0.4279 to 0.5007	No
12				
13	Hembras			
14	Valpr 300mg/kg vs. Cum 100 mg/kg	0.6000	0.1248 to 1.075	Yes
15	Valpr 300mg/kg vs. Valpr 150, Cum 50 mg/kg	0.3000	-0.1752 to 0.7752	No
16				
17	Macho y hembras			
18	Valpr 300mg/kg vs. Cum 100 mg/kg	0.4000	0.06397 to 0.7360	Yes
19	Valpr 300mg/kg vs. Valpr 150, Cum 50 mg/kg	0.2000	-0.1360 to 0.5360	No
20				
21				
22	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.
23				
24	Machos			
25	Valpr 300mg/kg vs. Cum 100 mg/kg	0.6364	0.5000	0.1364
26	Valpr 300mg/kg vs. Valpr 150, Cum 50 mg/kg	0.6364	0.6000	0.03636
27				
28	Hembras			
29	Valpr 300mg/kg vs. Cum 100 mg/kg	0.6000	0.0	0.6000
30	Valpr 300mg/kg vs. Valpr 150, Cum 50 mg/kg	0.6000	0.3000	0.3000
31				
32	Macho y hembras			
33	Valpr 300mg/kg vs. Cum 100 mg/kg	0.6500	0.2500	0.4000
34	Valpr 300mg/kg vs. Valpr 150, Cum 50 mg/kg	0.6500	0.4500	0.2000

Tabla D-6. Resumen de tabulación de resultados del modelo de inducción química con PTZ

1					
2					
3					
4					
5					
6					
7	Summary				
8					
9					
10	ns				
11	ns				
12					
13					
14	*				
	ns				
16					
17					
18	*				
19	ns				
20					
21					
22	SE of diff.	N1	N2	q	DF
23					
24					
25	0.2072	11	10	0.6580	112
26	0.2072	11	10	0.1755	112
27					
28					
	0.2121	10	10	2.829	112
30	0.2121	10	10	1.414	112
31					
32					
33	0.1500	20	20	2.667	112
34	0.1500	20	20	1.333	112

Tabla D-7. Tabulación de resultados del modelo de electroshock de alta intensidad (MES).

				I		1
	2way ANOVA					
	Tabular results					
1	Table Analyzed	Two-way ANOVA, not RM				
2						
3	Two-way ANOVA	Ordinary				
4	Alpha	0.05				
5						
6	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
7	Interaction	0.7375	0.9266	ns	No	
8	Tratamiento	2.028	0.3016	ns	No	
9	Genero	5.402	0.0434	*	Yes	
10						
11	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
12	Interaction	0.2190	4	0.05475	F (4, 110) = 0.2203	P = 0.9266
13	Tratamiento	0.6023	2	0.3012	F (2, 110) = 1.212	P = 0.3016
14	Genero	1.604	2	0.8022	F (2, 110) = 3.228	P = 0.0434
15	Residual	27.34	110	0.2485		
16						
17	Number of missing values	61				

Tabla D-8. Comparación de resultados entre los diferentes tratamientos y sexos implementados en el modelo de electroshock de alta intensidad (MES).

	Ourse ANOVA			
	2way ANOVA Multiple comparisons			
1	Within each column, compare rows (simple effects within columns)			
2				
3	Number of families	3		
4	Number of comparisons per family	2		
5	Alpha	0.05		
6				
7	Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
8				
9	Machos			
10	CMZ 10mg/kg vs. Cum 100 mg/kg	0.0	-0.4996 to 0.4996	No
11	CMZ 10mg/kg vs. CMZ 5 Cum 50 mg/kg	-0.1000	-0.5996 to 0.3996	No
12				
13	Hembras			
14	CMZ 10mg/kg vs. Cum 100 mg/kg	0.2889	-0.2244 to 0.8022	No
15	CMZ 10mg/kg vs. CMZ 5 Cum 50 mg/kg	0.0	-0.4996 to 0.4996	No
16				
17	Macho y hembras			
18	CMZ 10mg/kg vs. Cum 100 mg/kg	0.1000	-0.2533 to 0.4533	No
19	CMZ 10mg/kg vs. CMZ 5 Cum 50 mg/kg	-0.0500	-0.4033 to 0.3033	No
20				
21				
22	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.
23				
24	Machos			
25	CMZ 10mg/kg vs. Cum 100 mg/kg	0.6000	0.6000	0.0
26	CMZ 10mg/kg vs. CMZ 5 Cum 50 mg/kg	0.6000	0.7000	-0.1000
27				
28	Hembras			
29	CMZ 10mg/kg vs. Cum 100 mg/kg	0.4000	0.1111	0.2889
30	CMZ 10mg/kg vs. CMZ 5 Cum 50 mg/kg	0.4000	0.4000	0.0
31				
32	Macho y hembras			
33	CMZ 10mg/kg vs. Cum 100 mg/kg	0.5000	0.4000	0.1000
34	CMZ 10mg/kg vs. CMZ 5 Cum 50 mg/kg	0.5000	0.5500	-0.0500

Tabla D-6. Resumen de tabulación de resultados del modelo de electroshock de alta intensidad (MES).

_					
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7	Summary				
8					
9					
10	ns				
11	ns				
12					
13					
14	ns				
15	ns				
16					
17					
18	ns				
19	ns				
20					
21					
22	SE of diff.	N1	N2	q	DF
23					
24					
25	0.2230	10	10	0.0	110
26	0.2230	10	10	0.4485	110
27					
28					
29	0.2291	10	9	1.261	110
30	0.2230	10	10	0.0	110
31					
32					
33	0.1577	20	20	0.6343	110
34	0.1577	20	20	0.3172	110

Tabla D-7. Tabulación de resultados prueba de rotarod (pre-administración) con levetiracetam, cumarina y combinación de levetiracetam/cumarina en hembras.

1	Table Analyzed	*Hembras pre 6Hz
2		
3	Kruskal-Wallis test	
4	P value	0.5110
5	Exact or approximate P value?	Approximate
6	P value summary	ns
7	Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
8	Number of groups	3
9	Kruskal-Wallis statistic	1.343
10		
11	Data summary	
12	Number of treatments (columns)	3
13	Number of values (total)	30

Tabla D-8. Tabulación de resultados prueba de rotarod post- administración de levetiracetam, cumarina y combinación levetiracetam/cumarina en hembras.

4	Table Analysed	*Usesbass asst CU=
1	Table Analyzed	*Hembras post 6Hz
2		
3	Kruskal-Wallis test	
4	P value	0.4158
5	Exact or approximate P value?	Approximate
6	P value summary	ns
7	Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
8	Number of groups	3
9	Kruskal-Wallis statistic	1.755
10		
11	Data summary	
12	Number of treatments (columns)	3
13	Number of values (total)	30

Tabla D-9. Tabla de análisis de resultados de prueba rotarod pre-administración de levetiracetam, cumarina y combinación levetiracetam/cumarina en ratones macho.

1	Table Analyzed	Machos pre 6Hz
2		
3	Kruskal-Wallis test	
4	P value	0.0968
5	Exact or approximate P value?	Approximate
6	P value summary	ns
7	Do the medians vary signif. (P < 0.05	No
8	Number of groups	3
9	Kruskal-Wallis statistic	4.670
10		
11	Data summary	
12	Number of treatments (columns)	3
13	Number of values (total)	30

Tabla D-10. Tabla de análisis de resultados de prueba rotarod post-administración de levetiracetam, cumarina y combinación levetiracetam/cumarina en ratones macho.

Table Analyzed	Machos post 6 Hz
Kruskal-Wallis test	
P value	0.4813
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	1.463
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	30

Tabla D-11. Tabla de análisis de resultados de prueba rotarod pre- administración de ácido valproico, cumarina y combinación ácido valproico/cumarina en ratones hembra.

Table Analyzed	Hembras pre PTZ
Kruskal-Wallis test	
P value	0.8500
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	0.3251
Data summary	
-	3
Number of treatments (columns)	-
Number of values (total)	30

Tabla D-12. Tabla de análisis de resultados de prueba rotarod post- administración de ácido valproico, cumarina y combinación ácido valproico/cumarina en ratones hembra.

Table Analyzed	Hembras post PTZ
Kruskal-Wallis test	
P value	0.4620
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. $(P < 0.05)'$	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	1.544
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	30

Tabla D-13. Tabla de análisis de resultados de prueba rotarod pre- administración de ácido valproico, cumarina y combinación ácido valproico/cumarina en ratones macho.

Table Analyzed	Machos pre PTZ
Kruskal-Wallis test	
P value	0.4287
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	1.694
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	30

Tabla D-14. Tabla de análisis de resultados de prueba rotarod post- administración de ácido valproico, cumarina y combinación ácido valproico/cumarina en ratones macho.

Table Analyzed	Machos post PTZ
Table Allalyzed	Macrios post F12
Kruskal-Wallis test	
P value	0.9765
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	0.04757
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	30

Tabla D-15. Tabla de análisis de resultados de prueba rotarod pre- administración de carbamazepina, cumarina y combinación carbamazepina/cumarina en ratones hembra.

Table Analyzed	Hembras pre ME
Kruskal-Wallis test	
P value	0.9605
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)'	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	0.08059
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	30

Tabla D-16. Tabla de análisis de resultados de prueba rotarod post- administración de carbamazepina, cumarina y combinación carbamazepina/cumarina en ratones hembra.

Table Analyzed	Hembras post MES
Kruskal-Wallis test	
P value	0.5918
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	1.049
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	30

Tabla D-17. Tabla de análisis de resultados de prueba rotarod pre- administración de carbamazepina, cumarina y combinación carbamazepina/cumarina en ratones macho.

Machos pre MES
0.6866
Approximate
ns
No
3
0.7520
3
30

Tabla D-18. Tabla de análisis de resultados de prueba rotarod post- administración de carbamazepina, cumarina y combinación carbamazepina/cumarina en ratones macho.

Table Analyzed	Machos post MES
Kruskal-Wallis test	
P value	0.7000
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	0.7135
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	30

Bibliografía

Abu-Aisheh MN, Al-Aboudi A., Mustafa MS, El-Abadelah MM, Ali SY, Ul-Haq Z, Mubarak MS. Coumarin Derivatives as Acetyl- and Butyrylcholinestrase Inhibitor: An in Vitro, Molecular Docking and Molecular. Estudio de Simulaciones Dinámicas. *Heliyón*. 2019; 5: e01552. doi: 10.1016/j.heliyon. 2019.e01552.

Aghdash SN. Herbal Medicine in the Treatment of Epilepsy. Curr Drug Targets. 2021; 22(3):356-367. doi: 10.2174/1389450121999201001152221.

Ainsworth C. Networking for new durgs. Nature Medicine. 2011; 17: 1166-1168.

Annunziata F., Pinna C., Dallavalle S., Tamborini L., Pinto A. An Overview of Coumarin as a Versatile and Readily Accessible Scaffold with Broad-Ranging Biological Activities. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21:4618. doi: 10.3390/ijms21134618.

Apseloff G, Hilliard JB, Gerber N, Mays DC. Inhibition and induction of drug metabolism by psoralens: alterations in duration of sleep induced by hexobarbital and in clearance of caffeine and hexobarbital in mice. *Xenobiotica*. 1991; 21(11):1461-1471.

Arango DM, Vergel NE, Ospina LF, Rosas JE, Martinez F, Guerrero MF. Enhanced Anticonvulsant Activity of Coumarin in Mice after its Microencapsulation in Eudragit® E100 Microparticles. *Lat. Am. J. Pharm.* 2015; 34(10): 1920-5

Ariza S, Rincón J, Guerrero MF. Efectos sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico y fracciones de Hygrophila tyttha Leonard. Rev.Col.Cienc. Quim.Farm. 2006; 35 (1): 106-119.

Ariza S, Rueda D, Rincón J, Linares E, Guerrero M. Efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central inducidos por cumarina, aislada de Hygrophila tyttha Leonard. *Vitae*. 2007; 14 (2): 51-58.

Balamurugan E, Aggarwal M, Lamba A, Dang N, Tripathi M. Perceived trigger factors of seizures in persons with epilepsy. *Seizure*. 2013; 22(9): 743-747.

Bagetta G, Morrone LA, Rombolà L, Amantea D, Russo R, Berliocchi L, Sakurada S, Sakurada T, Rotiroti D, Corasaniti MT. Neuropharmacology of the essential oil of bergamota. *Fitoterapia*. 2010; 81: 453–461.

Barton M, Klein B, Wolf H, White H.Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. *Epilepsy Research*. 2001; 47(3): 217-227.doi.org/10.1016/S0920-1211(01)00302-3.

Barreiro-Arcos ML, Cremaschi G, Werner S, Coussio J, Ferraro G, Anesini C.Tilia cordata Mill extracts and scopoletin (isolated compound): differential cell growth effects on lymphocytes. *Phytother Res.* 2006; 20(1):34-40.

Berendt, M., Farquhar, R.G., Mandigers, P.J.J., Pakozdy, A., Bhatti, S.F.M., De Risio, L., Fischer, A., Long, S., Matiasek, K., Muñana, K., et al. International Veterinary Epilepsy Task Force consensus report on epilepsy definition, classification and terminology in companion animals. *BMC Veterinary Research*. 2015; 11, 182.

Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE

Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. Epilepsia. 2010 Apr;51(4):676-85. doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x.

Beyenburg S, Stavem K, Schmidt D. Placebo- corrected efficacy of modern antiepileptic drugs for refractary epilepsy: systematic review and meta-analysis. Neurology. 2010; 60: S13-S25.

Bhat MA, Al-Omar MA. Coumarin incorporated triazoles: a new class of anticonvulsants. Acta Pol Pharm. 2011; 68(6):889-95. PMID: 22125954.

Bilgin H, Atmaca M, Obaya B, Özekincib S, Ezel Taşdemirc E, Ketanid A. Protective effects of coumarin and coumarin derivatives against carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. Exp Toxicol Pathol. 2011; 63(4):325-30. doi: 10.1016/j.etp.2010.02.006. Epub 2010 Mar 5.

Bliss Cl. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology*. 1939; 26(3): 585-615. DOI: DOI 10.1111/j.1744-7348. 1939.tb06990. x.

Brodie MJ, Perucca E, Ryvlin P, Ben Menachem E, Meencke HJ. Comparison of levetiracetam and controlled-release carbamazepine in newly diagnosed epilepsy. Neurology. 2007; 68: 402-408.

Borges F, Roleira F, Milhanzes N, Santana L, Uriarte E. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: Occurrence, synthesis and biological activity. Curr. Med. Chem. 2005: 12:887–916. doi: 10.2174/0929867053507315.

Buntin K, Ertl P, Hoepfner D, Krastel P, Oakeley EJ, Pistorius D, Schuhmann T, Wong J, Petersen F. Deliberations on Natural Products and Future Directions in the Pharmaceutical Industry. Chimia (Aarau). 2021; 75(7):620-633. doi: 10.2533/chimia.2021.620.

Carlton, B. D., Aubrun, J. C., and Simon, G. S. Effects of Coumarin Following Perinatal and Chronic Exposure in Sprague-Dawley Rats and CD-1 Mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1996. 30 (1), 145–151. doi:10.1006/FAAT.1996.0051.

Castagné V, Hernier A.M., Porsolt R.D. CNS Safety Pharmacology. Reference Module inBiomedicalSciences.Elsevier,2014,https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.04931-X.

Castel-Branco, MM, Alves GL, Figueiredo IV, Falcão AC, Caramona MM. The maximal electroshock seizure (MES) model in the preclinical assessment of potential new antiepileptic drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2009; 31(2):101-106. doi: 10.1358/mf.2009.31.2.1338414. PMID: 19455265.

Chattha FA, Munawar MA, Kousar S. Plant growth regulating activity of coumarin derivatives. *Horticult In*. 2018; tJ2: 24–29.

Chaves ALP, Garzón NC, Cuca LE. Uso y manejo de la flora entre los Awa de Cuambi-Yaslambi, Barbacoas (Nariño, Colombia), Etnobotánica y Botánica económica. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2006.

Chen G, Portman R, Ensor CR, Bratton AC Jr. The anticonvulsant activity of o-phenyl succinimides. *J Pharmacol Exp Ther*. 1951; 103:54–61.

Diácono RM. Measuring motor coordination in mice. *J Vis Exp.* 2013;(75): e2609. doi: 10.3791/2609. PMID: 23748408; PMCID: PMC3724562.

Detsi A., Kontogiorgis C., Hadjipavlou-Litina D. Coumarin Derivatives: An Updated Patent Review (2015–2016) *Expert Opin. Ther. Pat.* 2017; 27:1201–1226. doi: 10.1080/13543776.2017.1360284.

Di Veroli GY, Fornari C, Wang D, Mollard S, Bramhall JL, Richards FM, Jodrell DI. Combenefit: an interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics*. 2016;32(18):2866-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btw230.

Eadie MJ. The use of antiepileptic drugs in clinical practice. In Eadie MJ, Vajda FJE (Eds) Antiepileptic drugs. Pharmacology and therapeutics, Springer, Berlin, 1999. pp. 589–614.

Elger CE, Schmidt D. Manejo moderno de la epilepsia: un enfoque práctico. Epilepsia Comportamiento. 2008; 12: 501 – 539.

Escobar, J. (2016). Estudio de la actividad anticonvulsivante de una pirazolo triazina obtenida por síntesis. Repositorio Universidad Nacional. Retrieved February 7, 2022, from

https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/58353/9737572.2016.pdf?sequence= 1&isAllowed=y

Felter SP, Vassallo JD, Carlton BD, Daston GP. A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics. Food Chem Toxicol. 2006;44(4):462-75. doi: 10.1016/j.fct.2005.08.019. Epub 2005 Oct 3. PMID: 16203076.

Fentem J, Fry J. (1993). Species differences in the metabolism and hepatotoxicity of coumarin. Comp. Biochem. Physiol. Part C. Vol.104, Issue 1:1-8. En: Martín-Aragón S. (1994). "Cumarinas en la prevención del estrés oxidativo dependiente de la edad". Memoria para optar al título de Doctor en Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacología. 202 p.

Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger C, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M y Wiebe S. Definición clínica práctica de la epilepsia. *Epilepsia*. 2014; 55(4); 475-482. doi: 10.1111/epi.12550.

Frearson J, Wyatt P Drug Discovery in Academia- the third way? Expert Opin. *Drug Discov*. 2010; 5(10):909-19. doi: 10.1517/17460441.2010.506508

Fonseca-Barriendos D, Frías-Soria CL, Pérez-Pérez D, Gómez-López R, Borroto Escuela DO, Rocha L. Drug-resistant epilepsy: Drug target hypothesis and beyond the receptors. Epilepsia Open. 2022 Aug;7 Suppl 1(Suppl 1):S23-S33. doi: 10.1002/epi4.12539.

Germán, R., & Santiago, C. Epilepsia refractaria – Refractory epilepsy. *Acta Neurológica Colombiana. Retrieved.* 2022, from https://www.acnweb.org/acta/acta_2010_26_1-33-46.pdf

Giardina, W. J. Models of Epilepsy: Electroshock and Chemical Induced Convulsions in the Mouse. *Current Protocols in Pharmacology*. 2001. doi:10.1002/0471141755.ph0522s10.

Girón C, Ruiz L, Guerrero M. Implementación del modelo de convulsión con descargas eléctricas de baja frecuencia. 2009. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Goiz-Marquez, G., Caballero, S. Epilepsia en perros. *Vet. Méx.* 2008. 39 (3), 279-321 from https://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2008/vm083e.pdf

Golub V, Reddy DS Cannabidiol Therapy for Refractory Epilepsy and Seizure Disorders. *Adv Exp Med Biol.* 2021; 1264:93-110. doi: 10.1007/978-3-030-57369-0_7.

Gorgus E, Lohr C, Raquet N, Guth S, Schrenk D. Limettin and furocoumarins in beverages containing citrus juices or extracts. *Food Chem.Toxicol*. 2010; 48: 93–98.

Geary N. Understanding synergy. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* 2013. 304(3): E237–E253. DOI: 10.1152/ajpendo.00308.2012.

Greco WR, Bravo G, Parsons JC. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. Pharmacol Rev. 1995 Jun; 47(2):331-85. PMID: 7568331.

Greco WR, Faessel H, and Levasseur L. The search for cytotoxic synergy between anticancer agents: ¿a case of Dorothy and the ruby slippers? *J Natl Cancer Inst.* 1996; 88(11): 699–700.

Harborne JB. Clases y funciones de los productos secundarios de las plantas En Sustancias químicas de las plantas: perspectivas sobre los productos secundarios de las plantas. Editado por Walton, NJ y Brown, *Imperial College Press.* 1999. págs. 1–25.

Holbrook, A.M., Pereira, J.A., Labiris, R., McDonald, H., Douketis, J.D., Crowther, M., 2 Wells, P.S. Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions. *3 Arch. Intern. Med.* 2005; 165, 1095–1106.

Hopkins, A. L. Network pharmacology: the next paradigm in drug Discovery. *Nature Chemical Biology*. 2008; 4, 682-690

Huang L, Yang S, Liou C, Hung P, Lai M, Wang C, Wang, T.Pentylenetetrazol-induced Recurrent Seizures in Rat Pups: Time Course on Spatial Learning and Long-term Effects. *Epilep*. 2002; 43 (6): 567-573.

Illingworth JL, Watson P, Ring H. Why do seizures occur when they do? Situations perceived to be associated with increased or decreased seizure likelihood in people with epilepsy and intellectual disability. *Epilepsy Behav*. 2014; **39**: 78-84.

IUPAC. Nomenclatura de Química Orgánica. Prensa de Pérgamo; Oxford, Reino Unido: 1979.

Kang SY, Lee KY, Sung SH, Kim YC. Four new neuroprotective dihydropyranocoumarins from Angelica gigas. *J Nat Prod.* 2005; 68 (1):56-59.

Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A., Brodie, M., Allen Hauser, W., & et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*. 2010; 51(6):1069–1077.

Kohling R. Voltage - gated sodium channels in epilepsy. *Epilepsia*. 2002; 43: 1278 - 1295.

Kumar AK, Renuka N, Pavithra G, Kumar GV Comprehensive review on coumarins: Molecules of potential chemical and pharmacological in- terest. *J Chem Pharm Research*. 2015. 7: 67–81.

Kummerle AE, Vitorio F., Franco DP, Pereira TM Compuestos cumarínicos en química médica: algunos ejemplos importantes del último año. actual Cima. Medicina. *química* 2018; 18:124–128. doi: 10.2174/1568026618666180329115523.

Lamprea N, Guerrero M, Munevar A y Lamprea M. Interacción entre el extracto de Hygrophila tyttha y la escopolamina en una prueba de memoria episódica en ratas. *Acta biol. Colomb.* 2009; Vol. 14 No. 2, 41- 48.

LAPA AJ, SOUCCAR C, LIMA MT, LIMA TCM. Métodos farmacológicos para el estudio de actividad sobre el sistema nervioso central. In: CYTED/ CNPq (Ed), Métodos de evaluación de la actividad farmacológica de plantas medicinales. 2002. pp 70:90.

Lake, B. G., and Grasso, P. Comparison of the Hepatotoxicity of Coumarin in the Rat, Mouse, and Syrian Hamster: a Dose and Time Response Study. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1996. 34 (1), 105–117. doi:10.1006/FAAT.1996.0181

Lubrich, C.; Giesler, P.; Kipp, M. Motor Behavioral Deficits in the Cuprizone Model: Validity of the Rotarod Test Paradigm. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 11342. https://doi.org/10.3390/ijms231911342.

Matos JM, Santana L, Uriarte E, Abreu OA, Molina E, Yordi EG Cou- marins – an important class of phytochemicals. In: Phytochemicals – Iso- lation, Characterization and Role in Human (Rao V, Rao LG, Ed.). *In Tech, Rijeka*. 2015; p. 113–140.

Matovu D, Cavalheiro EA. Differences in Evolution of epileptic seizures and topographical distribution of tissue damage in selected libic structures between male and female rats submitted to pilocarpine model. Front. Neurol. 2022; 13:802587. doi: 10.3389/fneur.2022.802587

Mareš P., Kubová H., CHAPTER 12 - Electrical Stimulation-Induced Models of Seizures, Editor(s): Asla Pitkänen, Philip A. Schwartzkroin, Solomon L. Moshé, Models of Seizures and Epilepsy, Academic Press. 2006; Pages 153-159, https://doi.org/10.1016/B978-012088554-1/50014-1.

Mohanraj R, Brodie MJ. Outcomes in newly diagnosed localization-related epilepsies. *Seizure*. 2005; 14:318–323.

Muhammad, J., Khan, A., Ali, A., Fang L., Yanjing W., Xu Q and Wei DQ., Network pharmacology: Exploring the resources and methodologies. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2018; 18;949-964.

Muke S, Kaikini A, Peshattiwar V, Bagle S, Dighe V, Sathaye S. Neuroprotective Effect of Coumarin Nasal Formulation: Kindling Model Assessment of Epilepsy. *Front Pharmacol*. 2018; 9:992. doi: 10.3389/fphar.2018.00992. PMID: 30233371; PMCID: PMC6129593.

Payá M, Halliwell B, Hoult JR. Interactions of a series of counmarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochem Pharmacol.* 1992; 44 (2): 205-14.

Pitkänen, A., Kyyriäinen, J., Andrade, P., Pasanen, L., & Ndode-Ekane, X. E. (2017). In A. Pitkänen, P. S. Buckmaster, A. S. Galanopoulou, & S. L. Moshé (Eds.), Epilepsy after traumatic brain injury. In models of seizures and epilepsy. 2017; pp. 661–682 (Second ed.).

Remy S, Beck H. Molecular and celular mechanism of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain*. 2006; 129: 18-35, https://doi.org/10.1093/brain/awh682.

Stables JP, Bertram EH, White HS, Coulter DA, Dichter MA, Jacobs MP, LöscheR W, Lowenstein DH, Moshe SL, Noebels JL, Davis M. Models for epilepsy and epileptogenesis: report from the NIH workshop, Bethesda, Maryland. *Epilepsia*. 2002; 43: 1410-1420.

Stables, J.P., Bertram, E., Dudek, F.E., Holmes, G., Mathern, G., Pitkänen, A., and White, H.S. Therapy discovery for pharmacoresistent epilepsy and for disease-modifying

therapeutics: summary of the NIH/NINDS/AES models II workshop. *Epilepsia*. 2003; 44: 1472–1478.

Schachter SC. Current evidence indicates that antiepileptic drugs are antiictal, not antiepileptic. *Epilepsy Research*. 2002. 50:67–70.

Scharfman HE, MacLusky NJ. Sex differences in the neurobiology of epilepsy: A preclinical perspective. *Neurobiology of Disease*. 2014; 72, 180–192. doi:10.1016/j.nbd.2014.07.004

Schmidt D, Löscher W. New development in antiepileptic drug resistance: an integrative view. *Epilepsia Curr.* 2009; 9: 47-52.

Sgaragli G, Valoti M, Gorelli B, Fusi F, Palmi M, Mantovani P. (1993). Calcium antagonist and antiperoxidant properties of some hindered phenols. *Br. J. Pharmacol.* 110, 369-377. En: Martín-Aragón S. (1994). "Cumarinas en la prevención del estrés oxidativo dependiente de la edad". Memoria para optar al título de Doctor en Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacología. 202 p.

Shanmugasundaram P., Venkataraman S., Hepatoprotective and antioxidant effects of Hygrophila auriculata (K. Schum) Heine Acanthaceae root extract. *Journal of Ethnopharmacology.* 2006; Volume 104, Issues 1–2, 124-128.

Shorvon SD, Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE; the first 50 years 1909-1958. *Epilepsia*. 2009; 50 (suppl 3): 69-92.

Shorvon SD, Drug treatment of epilepsy in the the century of the ILAE: The second 50 years 1959-2009. *Epilepsia*. 2009, 50 (suppl 3); 93-130

Singhuber J., Baburin I., Ecker G.F., Kopp B., Hering S. Insights into structure–activity relationship of GABA A receptor modulating coumarins and furanocoumarins. Eur. J. Pharmacol. 2011; 668:57–64. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.06.034.

Skalicka-Woźniak K, Orhan IE, Cordell GA, Nabavi SM, Budzyńska B. Implication of coumarins towards central nervous system disorders. *Pharmacol Res.* 2016. 103: 188–203.

Sun, W., Sanderson, P. E., & Zheng, W. Drug combination therapy increases sucessful drug repositioning. *Drug Discovery*. 2016 21, 1189–1195.

Swinyard, E.A. Electrically induced convulsions. In Experimental models of epilepsy: A Manual for the Laboratory Worker. Ed. D.P. Purpura, J.K. Penry, D. Tower, D.M. Woodbury, and R. Walter. 1972; pp. 433–458. New York: Raven Press.

Tasso SM, Moon SCh, Bruno-Blanch LE, Estiu GL. Characterization of the anticonvulsant profile of valpromide derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2004; 12(14):3857-69.

Tang J, Wennerberg K, and Aittokallio T. What is synergy? The Saariselka agreement revisited. *Front Pharmacol.* 2015. 6: 181. DOI: 10.3389/fphar.2015.00181.

Torres M, Castillo E, Camargo J. Resistencia farmacológica en epilepsia. *Acta Neurol Colomb*. 2007; 23 (4): 278-285.

Wassenaar M, Kasteleijn-Nolst Trenité DGA, de Haan G-J, Carpay JA, Leijten FSS. Seizure precipitants in a community-based epilepsy cohort. *J Neurol*. 2014; 261(4): 717- 724.

Worthington RJ and Melander C. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. *Trends Biotechnol.* 2013. 31(3): 177–84. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.12.006.

Zhao W, Sachsenmeier K, Zhang L, Sult E, Hollingsworth RE, Yang H. Un modelo de independencia de New Bliss para analizar datos de combinación de fármacos. *Revista de detección biomolecular.* 2014;19(5):817-821. doi: 10.1177/1087057114521867

Zhu JJ, Jiang JG. Pharmacological and Nutritional Effects of Natural Coumarins and Their Structure-Activity Relationships. Mol Nutr Food Res. 2018 Jul;62(14):e1701073. doi: 10.1002/mnfr.201701073.