Actividad del Flumazenil sobre el efecto depresor del Baclofén

Flumazenil acctivity on the depressing effect induced by Baclofen

Tibisay del C Rojas A[1], Nelson Vicuña F[2], Carlos R Marín M[3]

RESUMEN

Es un estudio experimental tipo ensayo terapéutico realizado en 200 ratones machos cepa NMRI, de 8 a 12 semanas de edad y peso de 31,7 gr pertenecientes al bioterio de la Universidad de Los Andes, con la finalidad de determinar si el Flumazenil es un antagonista competitivo o no competitivo, y su actividad sobre el efecto depresor inducido por el Baclofén mediante la evaluación de la actividad locomotora y la prueba de la barra horizontal. Previamente se estableció la dosis letal del Baclofén en 110 ratones, obteniendo una DL50 de 40,88 mg/kg para este estudio. Los resultados indican que el Flumazenil elevó la dosis letal a 47,92 mg/kg. En la prueba de la barra horizontal, prolongó el tiempo de caída de los ratones. Sobre la actividad locomotora, la administración de Baclofén produjo una reducción durante la 1ª hora (22,71%), y elevación durante la 2ª y 3ª horas (45,27% y 30,62% respectivamente). En el grupo tratado con Flumazenil más Baclofén se observó una reducción de la actividad locomotora en la tres horas de observación (67,47%, 60,12% y 45,85%) Se comprobó que no existe desvío de paralelismo entre las dos rectas de la curva gráfica de dosis-respuesta. Conclusión: No se conoce un antídoto efectivo para contrarrestar la depresión del SNC inducida por el Baclofén. El Flumazenil es un antagonista competitivo que actúa a nivel de los receptores gammaaminobutíricos. Se demostró en este estudio que el Flumazenil retrasó la mortalidad inducida por el Baclofén.

Palabras clave: Flumazenil, Baclofén, depresión, actividad locomotora, SNC, ratones.

SUMMARY

It is a comparative study and experimental field conducted in 100 male mice NMRI class, 8 to 12 weeks and weighing 31.7 grams of bioterio de la Universidad de Los Andes, with the aim of establishing the locomotor activity and test bar horizontal Flumazenil on the depressing effect induced by Baclofen. Before establishing the dose lethality of baclofen in 40.88 mg / kg for this study. The results indicate that Flumazenil rose 47.92 a lethal dose mg / kg. In proof of the horizontal bar, prolonged the time to drop in mice. In the group treated with Flumazenil more Baclofen was observed a reduction in activity locomotive to three hours, while Baclofen produced declined during the first hour, 1, and elevators during the 2 nd and 3 rd hour. It was found that there is no parallelism between the two lines of the dose-response curve. Conclusion: There is no known antidote to counteract the effects of the central nervous system depression induced by Baclofen. The Flumazenil is an antagonist benzodiazepines, which operates a level of receptors ganmaaminobutíricos, was demonstrated in this study decrease in mortality induced by Baclofen.

Keywords: Flumazenil, Baclofen, Depression, Locomotor activity, Lethal Dose, SNC, Mouse.

1 Médico Toxicólogo. Profesora Asistente de la Unidad de Toxicología del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes. Mérida – Venezuela.

2 Médico Farmacólogo. Profesor Titular Jubilado del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes. Mérida – Venezuela. Fax (0274) 2403108.

3 Cirujano Pediatra Urólogo Infantil. Profesor Asociado del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes. Mérida – Venezuela. Jefe del Servicio de Cirugía Pediátrica del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes. Fax (0274) 2403108.
tibirojas@hotmail.com. Fax (0274) 2403108 - (0414) 7467911. Av. Tulio Febres Cordero. Mérida-Venezuela.

INTRODUCCIÓN

El Flumazenil es una imidazobenzodiazepina de uso clínico desde 1991, actúa en receptores de la corteza cerebral, sistema límbico y cerebelo[1] a nivel del complejo GABA A y es útil para la intoxicación por benzodiazepinas[1], para revertir efectos sedativos de la anestesia general y/o procedimientos diagnóstico-terapéuticos[2]. Antagoniza el efecto benzodiacepínico por su afinidad a nivel de los receptores[2] mencionados. En 1996 se reportó[3] el uso del Flumazenil para el diagnóstico del coma (producido por alcohol, *cannabis,* carbamazepina y prometazina y otros de etiología desconocida), en el estupor recurrente idiopático y la encefalopatía hepática. El Baclofén es una sustancia que actúa estimulando receptores a nivel del complejo GABA B en el SNC y ha demostrado ser el agente más efectivo para el incremento del tono extensor y el *clonus* en el tratamiento de la espasticidad[2]. Sin embargo produce efectos colaterales significativos tales como somnolencia y depresión respiratoria. El Flumazenil reduce estos efectos al competir con los receptores. En el año 1992[4] se reportan dos casos de tétanos con depresión inducida por el Baclofén, contrarrestados con Flumazenil. Otros estudios[5] han registrado casos en los que el Flumazenil falló en revertir la intoxicación aguda por Baclofén[6], por lo que es motivo de interés de los autores realizar estudios para dilucidar los beneficios del fármaco. Se propone una investigación experimental tipo ensayo terapéutico con la finalidad de establecer si el Flumazenil se comporta como un antagonista competitivo o no competitivo ante la depresión inducida por las dosis de baclofén.

MATERIAL Y MÉTODOS

Es una investigación experimental tipo ensayo terapéutico realizada en el Laboratorio del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de los Andes (Mérida-Venezuela). Se utilizaron 200 ratones machos, de la cepa NMRI, de 8 a 12 semanas de edad, con un peso promedio de 31,7 gramos, provenientes del bioterio de la ULA, los cuales fueron aclimatados en el laboratorio tres días antes del experimento. Los animales fueron alojados en jaulas, en grupos de 10 en el vivario del Departamento de Farmacología, bajo condiciones ambientales controladas (temperatura 25 °C, luz 6.00 am-7.00 pm, oscuridad 7.00 pm-6.00 am). Fueron alimentados con Ratarina (Protinal) granulada (avena molida: 34,5%, trigo molido 45%, harina de carne 11,35%, melaza 5%, sal común 1% y premezcla) y agua a libre demanda. Se utilizaron tablas de recolección para el registro de mortalidad de los ratones. Se emplearon dos fármacos: Baclofén (Lioresal®). Composición: baclofeno 300 mg, glicerina o agua destilada c.s.p, metilcelulosa al 1% 15 ml, jarabe simple c.s.p 60 ml, vial Nº AP 0001, como droga pura en forma de polvo. La dosis de 1 ml equivale a 20 mg.

Flumazenil: (Romazicon®, Lanexate®, Mazicom®). Composición: 8 – fluoro - 5,6 dihidro - 5 metil – 6 – oxo - 4H - imidazo [1,5-a] [1,4] benzodiazepina-3-carboxilato de etilo). El flumazenil se inyectó sin diluir. La dosis de 1 ml equivale a 0,1 mg.

Ambos fármacos se administraron por vía intraperitoneal. El baclofén fue disuelto en agua destilada alcalinizada con 1 ml de hidróxido de sodio al 0.1% en una solución de 2 mg/ml. El volumen de baclofén y flumazenil no sobrepasó 1 ml (es decir, 20 mg de baclofén y 0,1 mg de flumazenil).

El trabajo se realizó en dos etapas. La etapa I consistió en determinar la dosis letal del baclofén, ya que no se tenían reportes al respecto. Para ello se tomaron 110 ratones (10 en cada jaula), los cuales se separaron a su vez en dos grupos. El grupo 1 formado por 70 ratones, (10 en cada jaula), a los que se les administró en orden decreciente 150; 125; 75, 50; 25; 12,5 y 6,25 mg/kg/p de baclofén; y el grupo 2 formado por 40 ratones (10 en cada jaula) a los que se les administró en orden creciente: 12,5; 25; 37,5 y 50 mgk/g/p de baclofén.

La etapa II comprende 90 ratones (10 en cada jaula) divididos en dos grupos. El grupo 1 compuesto por 50 ratones que recibieron 1mg/kg/p de flumazenil; y en forma creciente 12,5; 25; 37,5; 50 y 62,5 mg/kg/p de Baclofén con la finalidad de medir la dosis letal del baclofen. El grupo 2, formado por 40 ratones divididos en un subgrupo para medir la actividad locomotora y otro para medir la prueba de la barra horizontal. Se midió la actividad locomotora en 10 ratones que habían recibido 12,5 mg/kg/p de baclofén y la actividad locomotora de 10 ratones a los que se les suministró 1 mg/kg/p de flumazenil + 12,5 mg/kg/p de baclofén. Finalmente se realizó la prueba de la barra horizontal en 10 ratones que recibieron 37,5 mg/kg/p de baclofén y 10 ratones que

recibieron 1 mg/kg/p de flumazenil + 37,5 mg/kg/p de baclofén.

Estudio previo para determinar la dosis letal del Baclofén

Los ratones fueron divididos en subgrupos de 10 para cada dosis. Por cuanto no se encontró en la literatura datos sobre la Dosis Letal 50 (DL_{50}) del baclofén, se seleccionó una dosis alta de 150 mg/kg/peso, la cual produjo una mortalidad del 100% en los ratones. Seguimos administrando dosis proporcionalmente menores (125, 75,50 mg/kg/peso) y en todos la mortalidad fue del 100%. Al llegar a 25 mg/kg/p no se registró mortalidad, entonces continuamos con una dosis baja que no matara a ninguno, como fue 12,5 mg/kg/peso y luego 6,5 mg/kg/peso.

Curva de dosis - respuesta letal, previa administración de Baclofén

Los animales fueron divididos en 10 grupos de 10 ratones cada uno.

Se inyectó IP:12,5; 25; 37,5 y 50 mg/kg/p de baclofén.

Curva de dosis – respuesta letal, previa administración de Flumazenil + Baclofén

En todos los ratones se administró 1 mg/kg de flumazenil e inmediatamente se inyectó baclofén en el siguiente orden: 12,5; 25; 37,5; 50 y 62,50 mg/kg/p. Se determinó la mortalidad en cada uno de los grupos experimentales dentro de las primeras 24 horas.

Actividad locomotora en ratones

Se utilizaron 20 ratones, los cuales fueron divididos en dos grupos de 10 ratones cada uno. Los animales se colocaron en el actímetro de células fotoeléctricas Leigh Valley Electronics, durante tres días consecutivos por períodos de tres horas diarias, para su acostumbramiento en el aparato mencionado. Al cuarto día se procedió a la inyección IP de baclofén a dosis de 12,5 mg/kg/p, y en el otro se administró una dosis de 1 mg/kg/peso de flumazenil e inmediatamente 12,5 mg/kg/p. de baclofén; posteriormente se evaluó la actividad locomotora durante tres horas en el actímetro.

Prueba de la barra horizontal (Dowel test)

Esta prueba fue utilizada por Chan, Langan y colaboradores[7] para estudiar los efectos del Ro15-1788 en las acciones del etanol. El aparato consistió en una barra de madera dura horizontal, de 2 cm de diámetro y 30 cm de longitud, colocada 45 cm por arriba de una superficie suave. Los ratones se dividieron en dos subgrupos. Se tomaron 20 ratones. Se colocaron en forma individual 10 ratones sobre la barra de madera, previo a su colocación en la barra se inyectó una dosis de 37,5 mg/kg de peso de baclofén IP, y los otros 10 también fueron colocados individualmente en la barra, y previamente se inyectó una dosis de 1 mg/kg de flumazenil más 37,5 mg/kg de peso de baclofén. El tiempo de caída de los animales fue registrado (segundos después de la inyección). Se le asignó un tiempo de caída de 1.200 seg.

Valoración estadística

Los datos fueron procesados bajo el SPSS (Statistics Packgage Social Sciences) y Stat Graphis. Para las curvas de dosis respuesta letal se aplicó el análisis de regresión lineal. Las diferencias observadas se evaluaron mediante la prueba de t para muestras independientes $t > 0,005$ (no pareados).

Estudio previo para determinar la dosis letal de baclofen

Grupo experimental	Subgrupo	Nº de ratones	Dosis
ETAPA I Estudio piloto con Baclofén para determinar Dosis Letal de Baclofén	1	10	150 mg/kg baclofén
	2	10	125 mg/kg baclofén
	3	10	75 mg/kg baclofén
	4	10	50 mg/kg baclofén
	5	10	25 mg/kg baclofén
	6	10	12.5 mg/kg baclofén
	7	10	6.25 mg/kg baclofén
Dosis-respuesta letal al Baclofén	1	10	12.5 mg/kg baclofén
	2	10	25 mg/kg baclofén
	3	10	37.5 mg/kg baclofén
	4	10	50 mg/kg baclofén
ETAPA II Dosis-respuesta letal al Baclofén previo flumazenil	1	10	1 mg/kg flum. previo + 12.5 mg/kg baclofén
	2	10	25 mg/kg baclofén
	3	10	37.5 mg/kg baclofén
	4	10	50 mg/kg baclofén
	5	10	62.5 mg/kg baclofén
Actividad locomotora	1	10	12.5 mg/kg baclofén
	2	10	1 mg/kg flum + 12.5 mg/kg baclofén
Prueba de la barra horizontal	1	10	37.5 mg/kg baclofén
	2	10	1 mg/kg flum + 37.5 mg/kg baclofén
TOTAL		**200**	

RESULTADOS

Tabla 1
Porcentaje de mortalidad de ratones inducida por Baclofén.
(Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina ULA)

Baclofén (Dosis)	sin Flumazenil Mortalidad		con Flumazenil Mortalidad	
	Nº	%	Nº	%
12,5mg/kg/p	0	0	0	0
25 mg/kg/p	1	10	1	10
37,5 mg/kg/p	1	10	4	40
50 mg/kg/p	10	100	6	60
62,5 mg/kg/p	10	100	8	80

*administrado por vía intraperitoneal.

Tabla 2
Actividad locomotora registrada en el Actímetro (horas). Actividad basal y posterior a la administración de Baclofén.
(Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina ULA)

Subgrupos	I Hora	II Hora	III Hora
Actividad Basal	4158	1544	787
Con Baclofén	3214	2243	1028

Tabla 3
Actividad locomotora registrada en el actímetro (horas) posterior a la administración de Baclofén. Previa aplicación de Flumazenil.
(Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina ULA)

Subgrupos	I Hora	II Hora	III Hora
Actividad basal	4644	3506	2305
Con Baclofén+ previo Flumazenil*	1511	1398	1248

+ dosis de 12,5 mg/kg
* dosis de 1 mg/kg.

Tabla IV
Tiempo promedio de caída de los ratones tratados con Baclofén.
(Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina ULA)

Subgrupos	Promedio de caída (seg.)
Baclofén*	881.1
Flumazenil + Baclofén	976.1

* dosis 37,5 mg/kg.

Curva de dosis-respuesta letal en ratones

El estudio previo para determinar la dosis letal de baclofen determinó que fue hasta una dosis de 75 mg/kg en la que murieron todos los ratones, por lo que se seleccionó ésta como la dosis a partir de la cual se comenzó la reducción gradual para el resto de los grupos. La dosis letal 50, se calculó mediante la ecuación de la recta obtenida por regresión lineal, que en este caso resultó en 40,88 mg/kg.

Actividad locomotora en ratones

Cuando se aplicó una dosis de baclofén de 12.5 mg/kg se produjo una disminución de la actividad locomotora de 4158 horas a 3214 horas, lo que representó el 22,71% en la primera hora en relación a la actividad basal; sin embargo, en la segunda y tercera horas la actividad aumentó de 2243 horas y 1028 horas respectivamente, lo cual representa un aumento de 45.27 y 30.62% respectivamente. En el grupo tratado con baclofén + flumazenil se produjo una reducción de 4644 horas a 1511 horas, de 3506 hs a 1398 hs y de 2305 hs a 1248 hs, en la 1ª, 2ª y 3ª horas respectivamente, lo cual representa una reducción de 67,47; 60,12 y 45,85% respectivamente. El diseño de la prueba no permite valorar estadísticamente este resultado.

Prueba de la barra horizontal

El grupo que recibió sólo baclofén tuvo un tiempo de caída promedio de 881,1 segundos. El grupo tratado con baclofén + flumazenil, tuvo un tiempo de caída promedio de 976,1 segundos. La diferencia observada no fue estadísticamente significativa.

DISCUSIÓN

La actividad del flumazenil sobre el efecto depresor inducido por el baclofén no fue estadísticamente significativa en este estudio. Se evidenció el efecto depresor del baclofén y la forma ligera como el flumazenil contrarrestó el mismo. En vista de que no existen reportes en la bibliografía consultada al respecto se administró dosis crecientes de baclofén para la realización de la curva de dosis-respuesta-letal, evidenciándose el efecto depresor cuando se suministraron 50 mg/kg del mismo. A esta dosis progresiva los ratones siguieron la secuencia de depresión, hipnosis, anestesia y muerte. La dosis letal para el baclofén se estableció en 40,88% y al administrar el flumazenil se elevó a 47,92%.

Las dos rectas obtenidas no son paralelas, por lo que no existe significancia estadística. Si observamos el efecto del flumazenil sobre la mortalidad de los ratones encontramos que la misma disminuyó de 100 a 60% en el grupo que recibió 50 mg/Kg. de baclofén, se evidencia así un ligero antagonismo del flumazenil sobre el baclofén, el cual puede ser no competitivo, por cuanto se observó una disminución de la pendiente, con una prueba de paralelismo negativa, lo que indica que no tienen mecanismo de acción similares. Estos resultados concuerdan con otros reportes que señalan que el flumazenil revirtió la depresión central. La administración de dosis crecientes de baclofén desencadenaron coma y depresión respiratoria[4,5].

Un grupo de investigadores[8] reportó el caso de una paciente que recibió inadvertidamente una sobredosis intratecal de baclofén, a quien se le suministró flumazenil para cotrarrestar el efecto sobre el SNC, obteniendo como resultado que el flumazenil no logró antagonizar el efecto depresor. Otro autor[6] utilizó una dosis de 10 mg/kg. de flumazenil en ratas que inicialmente recibieron baclofén, la cual no revirtió la depresión inducida por este fármaco.

Existen estudios[9] que señalan un efecto dual con el flumazenil. Estos estudios establecen que dosis de 1-30 mg/kg provocan un efecto antagonista o agonista inverso y dosis de 30-50 mg/kg se comportan como agonistas del receptor de las benzodiazepinas.

La valoración de la actividad locomotora y la prueba de la barra horizontal son experimentos que permiten evaluar la actividad estimulante o depresora en forma general. Con relación a la actividad locomotora, se observó una disminución en la primera hora, sin embargo, en la segunda y tercera hora, hubo un aumento de la actividad, lo cual pudiera explicarse por el fenómeno de rebote que se observa con drogas depresoras, luego de una fase de depresión sigue una fase de estimulación.

Cuando estudiamos la influencia del flumazenil sobre la actividad locomotora bajo efectos del baclofén, se encontró un descenso de la actividad locomotora. Esta aparente sinergia es contradictoria, y no se puede explicar por un fenómeno agonista del flumazenil, por cuanto esta droga no antagoniza con los receptores GABA B, aunque se ha descrito que a altas dosis tiene acción agonista del receptor de benzodiazepina, sin embargo la dosis administrada fue de 1 mg/kg, considerada como baja; pudiera tratarse de un efecto de sinergia o potenciación fisiológica, en el cual el baclofén actúa en el receptor GABA B y el flumazenil actuaría en otro nivel de integración, sea el receptor distinto GABA A o cualquier otro, lo cual ameritaría mayor estudio.

Existen reportes[10] que señalan que el baclofén tiene el efecto de disminuir la amplitud en el EEG en regiones corticales y del hipocampo en ratas tratadas persistentemente con flumazenil, por tanto esto podría sugerir cambios conformacionales producidos en el complejo GABA/BZD, por ocupación del receptor de BZD, que tendría un efecto facilitatorio sobre las acciones de drogas que actúan en el complejo GABA/BZD, como pentobarbital, GABA y picrotoxina, los cuales antagonizan la reducción de la amplitud del EEG y lo cual no ocurren con diazepam.

Con respecto a la prueba de la barra horizontal pudimos observar que en el grupo de los ratones que recibieron baclofén a dosis de 37,5 mg/kg tuvieron un tiempo promedio de caída menor en contraposición al grupo que recibió flumazenil previo. Esta prolongación del tiempo de caída denota igualmente un antagonismo parcial, lo cual concuerda con el resultado sobre la mortalidad y discrepa de lo observado en la actividad locomotora, es decir, se observó un antagonismo parcial sobre la mortalidad y la coordinación motora, pero el flumazenil falla en antagonizar la disminución de la actividad locomotora, lo cual pudiera explicarse en un posible efecto sobre otros neurotransmisores conductuales. Sobre la base de los resultados anteriores, en los cuales

el flumazenil antagoniza débilmente la mortalidad y el tiempo de caída y sinergiza los efectos sobre la actividad locomotora, se deberían realizar estudios preclínicos exhaustivos y con diseños estadísticos establecidos, por lo tanto se justifica la realización de estudios clínicos controlados en casos de intoxicación con baclofén para caracterizar esta débil acción antagonista no competitiva encontrada.

CONCLUSIONES

– El flumazenil se comporta como antagonista no competitivo sobre el efecto depresor inducido por el baclofén.

– La actividad del flumazenil sobre el efecto depresor inducido por el baclofén fue ligera, los resultados no fueron estadísticamente significativos.

– La dosis letal del baclofén fue de 40,88%

– La dosis letal del baclofén cuando se administró el flumazenil fue de 47,92%.

– El flumazenil no redujo la mortalidad, pero prolongó la vida de los ratones ligeramente.

– El flumazenil no produjo efectos antagonistas sobre el baclofén en la actividad locomotora.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ford M, Olshaker J. Valoración del coctel del coma. Clínicas de urgencia de Norteamérica. México: Nueva Editorial Interamericana. 1994, pp. 303-313.
2. Hardman J, Limbird L, Molinoff P, Ruddon R. Pharmacodynamics. En Goodman & Gilmans: The pharmacological basis of therapeutics. (9 ed.) Texas: Editorial Mc Ggraw-Hill; 1996, p. 10024-10035.
3. Ferrer A, Civeira E, López P, Loren B. Clinical Pharmacology.1995; pp. 289-298.
4. Saissi J, Vitris M, Demaziere J, Seck M, Marcoux L, Gaye M. Anesthesiology 1992 (76): 1051-1053.
5. Saissi J, Demaziere J, Vitris M, Seck M, Marcoux L, Gave M, et al. Intensive-Care-Med. 1999: 18 (4): 241-44.
6. Wallace K, Curry S, Graeme K. Clinical Toxicology, 1997. 35 (5): 548.
7. Chang A, Langan M, Schanley D, Penetrante M, Leong F, Aldrich L. Pharmacology biochemistry & Behavior. 1998, 29: 315-320.
8. Byrne S, Watson G, Hardy P. Anesthesia. 1996. 51: 581-582.
9. Zarrindast M, Djavdan M. General Pharmacology.1998. 19 (5): 703-706.
10. Aley K, Kulkarni S, Mathur R, Nayar U. Indian Journal. Exp. Biol. 1990; 28 (12): 1149-1159.

Recibido: 30 de octubre de 2007 / Aprobado: 15 de junio de 2008