

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**ESTUDIO DEL EFECTO ANTICONVULSIVANTE DE LAS MACAMIDAS
SINTÉTICAS, 3-METOXI-N-BENCILOLEAMIDA Y 3-METOXI-N-
BENCILLINOLEAMIDA, EN UN MODELO DE EPILEPSIA INDUCIDO EN
RATAS *Sprague-Dawley*. AREQUIPA.**

Tesis Presentada por el Bachiller:

Moscoso Palacios, Rodrigo Martín

para optar el Título Profesional de:

Químico Farmacéutico

Asesora:

Dra. Nieto Montesinos, Rita Milagros

AREQUIPA – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20170000046853

N° Trámite en Fac. 1721-2017

Fecha 16-10-2017

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: **MOSCOSO PALACIOS, Rodrigo Martín**

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"ESTUDIO DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LAS MACAMIDAS SINTETICAS, 3-METOXI-N-BENCILOLEAMIDA Y 3-METOXI-N-BENCILLINOLEAMIDA, EN UN MODELO DE EPILEPSIA INDUCIDO EN RATAS Sprague-Dawley. AREQUIPA, 2017"

DICTAMINADORES: 1) Mgter. Angélica Corzo Salas 2) Q. F. Mocita De La Fuente Torres

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por la recurrente, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

Firmas:  (Devolver antes de 8 días hábiles) Fecha 30/11/2017

ASESOR: **Dra. Rita Nieto Montesinos**

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación se ha asesorado el presente Trabajo de Investigación y después de efectuadas las observaciones, considero que el título debe cambiar a: **"ESTUDIO DEL EFECTO ANTICONVULSIONANTE DE LAS MACAMIDAS SINTETICAS, 3-METOXI-N-BENCILOLEAMIDA Y 3-METOXI-N-BENCILLINOLEAMIDA, EN UN MODELO DE EPILEPSIA INDUCIDO EN RATAS Sprague-Dawley, AREQUIPA"** y luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes considero se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente

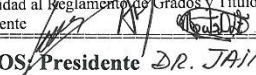
Firma  Fecha 13/03/2019

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dr. Jaime Cárdenas García**
- 2) **Mgter. Angélica Corzo Salas**
- 3) **Mgter Mocita De La Fuente Torres**

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por el recurrente, debiendo cambiar el título a: **"ESTUDIO DEL EFECTO ANTICONVULSIONANTE DE LAS MACAMIDAS SINTETICAS, 3-METOXI-N-BENCILOLEAMIDA Y 3-METOXI-N-BENCILLINOLEAMIDA, EN UN MODELO DE EPILEPSIA INDUCIDO EN RATAS Sprague-Dawley. AREQUIPA"**, y habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, consideramos que el presente trabajo de investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

Firma  (Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha

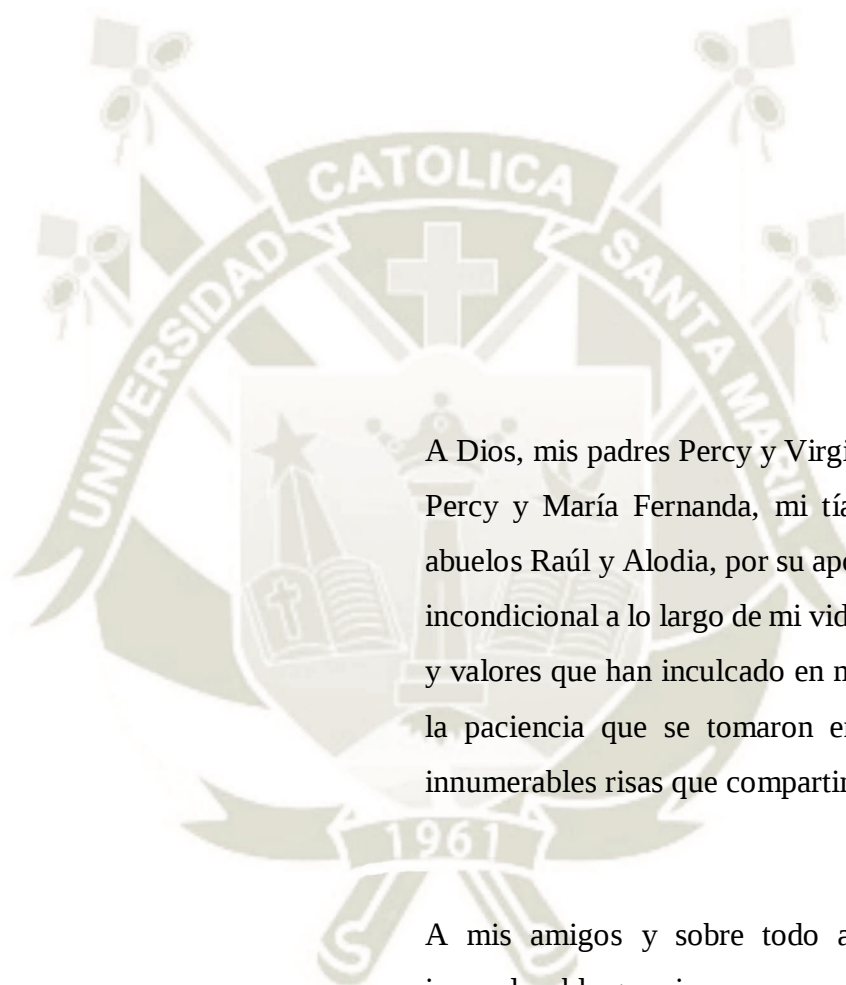
JURADOS: Presidente **DR. JAIME CÁRDENAS GARCÍA**
Vocal **MAG. ANGELICA CORZO SALAS**
Secretario **MAG. MOCITA DE LA FUENTE TORRES**

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 6/5/19 Hora: 19.00 Local: C- 402 (SUM)

DECANO

DEDICATORIA



A Dios, mis padres Percy y Virginia, mis hermanos Percy y María Fernanda, mi tía Mónica y a mis abuelos Raúl y Alodia, por su apoyo y comprensión incondicional a lo largo de mi vida, por sus consejos y valores que han inculcado en mí y sobre todo por la paciencia que se tomaron en apoyarme y las innumerables risas que compartimos juntos.

A mis amigos y sobre todo a mi única amiga irremplazable que siempre me apoya día a día desde el momento que la conocí, gracias por hacerme reír y sacar siempre lo mejor de mí. Eres el impulso que siempre necesité. Te Amo Alexa.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarme día a día, a mis padres por estar presente en los momentos más tensos y felices y a mis familiares que con su apoyo me dieron el impulso para lograr esta meta.

A José Villanueva, PhD, por su invaluable apoyo y consejos recibidos durante mi formación académica y la realización de este trabajo.

A mi asesora, la Dra. Rita Nieto Montesinos, por la orientación y el apoyo recibido para desarrollar y concluir esta meta tan importante.

A la facultad de ciencias farmacéuticas bioquímicas y biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María, por el apoyo durante mis estudios y la ejecución de mi tesis.

Al Centro de estudios Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences University (Boston-Estados Unidos), en especial al Dr. Alejandro Pino Figueroa por su apoyo en la donación de las macamidas sintéticas 3-metoxi-N-bencillinoileamida y 3-metoxi-N-benciloleamida.

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María por el financiamiento parcial para el desarrollo de esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

A Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) - Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT), por el financiamiento recibido para el desarrollo de esta investigación: “Estudio del efecto anticonvulsivante de las macamidas sintéticas, 3-metoxi-N-benciloleamida y 3-metoxi-N-bencilinoleamida, en un modelo de epilepsia inducido en ratas *Sprague-Dawley*, Arequipa”, mediante el proyecto: “Diseño, caracterización y evaluación de liposomas a base de macamidas, vectorizados al sistema nervioso central para el tratamiento de la epilepsia 096-2015-Fondecyt”.



INTRODUCCIÓN

Lepidium peruvianum Chacon sp. (Maca), es una planta de origen peruano, perteneciente a la familia *Brassicaceae*, domesticada entre los años 4000 y 1200 a.C.^(1,2). Esta planta es proveniente de la región de la sierra del país⁽³⁾, y es cultivada entre 3800 y 4800 m.s.n.m. en la cordillera de los Andes Centrales del Perú^(3,4).

Numerosas pruebas científicas demostraron que esta planta actúa como un suplemento nutritivo, regula las hormonas sexuales masculinas y femeninas, incrementa la memoria y aprendizaje, entre otros^(2,4-8). La Maca en su composición química presenta compuestos liposolubles, los cuales podrían tener actividad en el Sistema Nervioso Central (SNC). Es así que se realizó múltiples estudios como la evaluación de los efectos del extracto pentánico de Maca en el aprendizaje y memoria en ratas sanas y en ratas con déficit de memoria inducida por escopolamina⁽⁹⁾.

Estudios realizados por el Doctor Alejandro Pino Figueroa, docente del Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences (MCPHS) University, en Boston-Estados Unidos, demostraron la actividad neuroprotectora del extracto pentánico de Maca en un estudio *in vitro*, en neuronas de cangrejo sometidas a estrés oxidativo con H₂O₂ e *in vivo*, en ratas inducidas a accidente cerebro vascular isquémico⁽¹⁰⁾. Se demostró que algunos de los compuestos lipofílicos de la Maca podrían actuar a través del Sistema Cannabinoide en la protección de las células neuronales⁽¹⁰⁾. Las macamidas son metabolitos secundarios de la Maca y éstas serían responsables de varias de las propiedades de los extractos apolares de la Maca, principalmente de su efecto neuroprotector⁽¹¹⁾.

El Sistema Endocannabinoide (SEC) desempeña una función importante en la comunicación sináptica retrograda, la cual podría modular la actividad epileptogénica. El modelo de inducción de epilepsia por administración de pilocarpina en ratas utilizado, demostró que las macamidas sintéticas presentan un efecto anticonvulsivante a través del sistema endocannabinoide. Esto, debido a que estas poseen una estructura química similar a los endocannabinoides⁽¹²⁾. Los

endocannabinoides se liberan a partir de las neuronas postsinápticas en función de la demanda del organismo. Luego, los endocannabinoides se unen a los receptores endocannabinoides presinápticos (CB1), bloqueando la liberación del transmisor desde los terminales presinápticos. Diversas investigaciones en humanos manifestaron que las crisis epilépticas continuas podrían ocasionar una reorganización errónea del sistema endocannabinoide y al posible deterioro del efecto protector de éste⁽¹²⁾.

La epilepsia es una enfermedad cerebral crónica ocasionada por un disturbio cerebral, caracterizado por episodios de crisis convulsivas relacionadas a descargas eléctricas excesivas y recurrentes. Las convulsiones pueden ir desde episodios muy breves de ausencia o de contracciones musculares hasta convulsiones prolongadas y graves. Su frecuencia también puede variar desde menos de una al año hasta varias al día^(13,14).

Aproximadamente 50 millones de personas en todo el mundo padecen de esta enfermedad. Cerca del 80 % de las personas que tienen esta enfermedad viven en países de ingresos bajos y medianos. Aproximadamente el 70 % de los casos registrados responden al tratamiento, pero lamentablemente no se puede tener un dato certero ya que la mayoría de personas no reciben tratamiento alguno, ya sea por el aspecto económico o por falta de información y recursos⁽¹⁵⁾. Esta enfermedad afecta la calidad de vida de los pacientes ya que sufren discriminación y estigmatización social y en muchos casos los pacientes prefieren no buscar ayuda por temor a ser juzgados por la sociedad. En el siglo pasado había medidas extremas sobre aquellas personas que padecían de esta enfermedad, como el acceso restringido al ingreso de teatros y otros centros recreativos⁽¹⁵⁾.

En este trabajo de investigación se estudió el efecto neuroprotector de dos macamidas sintéticas, 3-metoxi-N-bencilinoleamida y 3-metoxi-N-benciloleamida en un modelo de epilepsia inducido por administración intraperitoneal de pilocarpina en ratas *Sprague-Dawley*. Adicionalmente se realizó un estudio de distribución cerebral de la macamida sintética 3-metoxi-N-bencilinoleamida, con la finalidad de identificar y cuantificar dicho analito en cerebro por cromatografía líquida de alta resolución.

RESUMEN

Las macamidas son metabolitos secundarios de la Maca, estos serían responsables de varias de las propiedades de los extractos apolares de esta planta. Debido a su naturaleza lipofílica, las macamidas podrían atravesar la barrera hematoencefálica y de esta manera podrían actuar en el Sistema Nervioso Central. Es así que esta investigación tuvo como objetivo principal evaluar el efecto de las macamidas sintéticas 3-metoxi-N-benciloleamida y 3-metoxi-N-bencillinoleamida en la atenuación del *status epilepticus* en un modelo de epilepsia inducida por administración de pilocarpina en ratas *Sprague-Dawley*. Las macamidas sintéticas ya mencionadas, fueron donadas por el Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences University (Boston, Estados Unidos), a través del Doctor Alejandro Pino Figueroa. Se validó el modelo de epilepsia por administración intraperitoneal de pilocarpina a una dosis 350 mg/kg de peso. Tal dosis induce al animal a una fase aguda caracterizada por constantes crisis epilépticas denominado *status epilepticus*. Se trabajó con 15 grupos experimentales, 6 grupos recibieron 3-metoxi-N-bencillinoleamida a dosis de 0.5, 1, 5, 10, 15 y 20 mg/kg de peso y otros 6 grupos recibieron 3-metoxi-N-benciloleamida a dosis de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mg/kg de peso. Los 3 grupos restantes recibieron carbamazepina a 25 mg/kg de peso, diazepam a 4 mg /kg de peso y el vehículo de administración (tetraglicol: polietilenglicol 600: agua

ultrapura). Todos los grupos recibieron los diferentes tratamientos por vía intravenosa (cola) tres horas y treinta minutos después de iniciado el *status epilepticus*. La efectividad de cada tratamiento se evaluó usando el score de Racine, el cual asigna un puntaje a los diferentes signos presentados como salivación, sangrado por mordedura de lengua, ataxia, rigidez de cuerpo o cola, movimiento de cabeza y movimiento clónico de patas anteriores durante el *status epilepticus*. Cada animal de experimentación fue evaluado según la escala de Racine a los 30 y 60 minutos post-administración de los tratamientos. El análisis estadístico reveló que hubo diferencia significativa entre los tratamientos aplicados, siendo la macamida sintética 3-metoxi-bencillinoleamida a una dosis de 10 mg/kg de peso, aquella que logra una actividad antiepiléptica similar al diazepam a 4 mg/kg de peso y carbamazepina a 25 mg/kg de peso. La macamida sintética 3-metoxi-benciloleamida solo logro tal efecto a una dosis de 20 mg/kg de peso. Se concluyó que las macamidas sintéticas 3-metoxi-N-bencillinoleamida y 3-metoxi-N-benciloleamida podrían tener un efecto antiepiléptico, dado que estas tienden a disminuir la intensidad del *status epilepticus*. Finalmente se estudió la distribución cerebral de la macamida sintética 3-metoxi-N-bencillinoleamida a una dosis de 10 mg/kg de peso por vía intravenosa a las 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 10 y 24 horas post-administración del tratamiento. Aunque se identificó la presencia de macamida en el cerebro hasta la segunda hora, en adelante dicho analito no fue identificable ni cuantificable.

Palabras clave: Epilepsia, *status epilepticus* (SE), macamida sintética, 3-metoxi-N-benciloleamida y 3-metoxi-N-bencillinoleamida.

ABSTRACT

Macamides are secondary metabolites of Maca, these would be responsible for several properties of the apolar extracts of this plant. Due to their lipophilic nature, macamides could cross the blood-brain barrier and therefore act in the Central Nervous System. Thus, this research project had as main objective to evaluate the effect of the synthetic macamides 3-methoxy-N-benzyloleamide and 3-methoxy-N-bencillinoleamide in the status epilepticus attenuation in a model of epilepsy induced by administration of pilocarpine in *Sprague-Dawley* rats. The aforementioned synthetic macamides were donated by Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences University (Boston, United States), through Doctor Alejandro Pino Figueroa. The epilepsy model was validated by intraperitoneal administration of pilocarpine at a dose of 350 mg/kg of weight. Such dose induces the animal to an acute phase characterized by constant epileptic seizures called status epilepticus. 15 experimental groups were used, 6 groups received 3-methoxy-N-bencillinoleamide at doses of 0.5, 1, 5, 10, 15 and 20 mg/kg of weight and other 6 groups received 3-methoxy-N-benzyloleamide at doses of 5, 10, 15, 20, 25 and 30 mg/kg of weight. The remaining 3 groups received carbamazepine at 25 mg / kg of weight, diazepam at 4 mg/kg of weight and the vehicle of administration (tetraglycol: polyethylene glycol 600: ultrapure water). All the groups received the different intravenous (tail) treatments three hours and thirty minutes after the beginning of the status epilepticus. The effectiveness of each treatment was evaluated using the Racine score, which assigns a score to the different signs presented as salivation, bleeding by tongue bite, ataxia, body or tail stiffness, head movement and clonic movement of forelegs during the status epilepticus. Each experimental animal was evaluated according to the Racine score 30 and 60 minutes post-administration of the treatments. The statistical analysis revealed that there was a significant difference between the administered treatments. Hence, the synthetic macamide 3-methoxy-bencillinoleamide at a dose of 10 mg/kg of weight achieves an antiepileptic activity similar to diazepam at 4 mg/kg of weight and carbamazepine at 25 mg/kg of weight. The synthetic macamide 3-methoxy-benzyloleamide only achieved this effect at a dose of 20 mg/kg of weight. Concluding, the synthetic macamides 3-methoxy-N-bencillinoleamide and 3-methoxy-N-benzyloleamide could

have an antiepileptic effect, since these tend to decrease the intensity of the status epilepticus. Finally, the cerebral distribution of the synthetic macamide 3-methoxy-N-bencillinoamide at a dose of 10 mg/kg of weight was studied intravenously at 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 10 and 24 hours post-administration of the treatment. Although the macamide was identified in the brain up to the second hour, the analyte was not identifiable or quantifiable thereafter.

Keywords: Epilepsy, *status epilepticus* (SE), synthetic macamidas, 3-methoxy-N-benzylinoamide and 3-methoxy-N-benzylinoamide.

