

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**EFFECTO ANTICONVULSIVANTE DE LA ASOCIACIÓN DE FENITOÍNA E
INHIBIDORES DE LA GLICOPROTEÍNA-P (ELACRIDAR Y TARIQUIDAR)
EN EL *ESTATUS EPILÉPTICO* INDUCIDO POR PILOCARPINA EN RATAS
Sprague-Dawley.**

Tesis presentada por la Bachiller:
Onque Quirita, Yemima Marcell
para optar el Título Profesional de
Químico Farmacéutico

Asesor:
Dra. Vera López, Karin Jannet

Arequipa- Perú
2019





DEDICATORIA

A Dios, a mis padres María y Marcial, mis hermanos; por todo su cariño, comprensión y su apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

Profesores y amigos que me apoyaron durante todo mi desarrollo académico.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por permitirme seguir disfrutando de la vida y acompañarme cada día, por darme salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres María y Marcial, por su sacrificio e incondicional apoyo, por sus consejos y valores, por la motivación constante que me permitió ser una persona de bien y por su infinito amor.

A la facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, por mi formación profesional, donde viví buenas y gratas experiencias personales y profesionales.

Al equipo de investigación del laboratorio de neurociencias y biología molecular, Dr. José Villanueva Salas, Dra. Karin Vera López, Dra. Rita Nieto Montesinos, Ing. José Carpio Carpio y Dra. Julitza Paredes Fuentes, por darme la posibilidad de participar en el proyecto, por la motivación y enseñanzas durante el desarrollo del proyecto.

De manera especial a mi asesora la Dra. Karin Vera López, por su apoyo y orientación en mi formación profesional; la confianza y el tiempo brindado durante desarrollo y redacción de este trabajo de investigación.

A mi compañera de proyecto Stefany Huaynasi Aguirre, por todo su apoyo, confianza y amistad durante la realización de la parte experimental del proyecto, que hizo posible la conclusión del mismo.

A quienes fueron docentes en mi preparación profesional y dictaminadores de tesis, Dra. Guillén Núñez, Dr. José Villanueva Salas y Dr. Gonzalo Dávila del Carpio, por brindarme su tiempo, orientación y consejos para la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) y al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT), por la oportunidad y el financiamiento recibido para el desarrollo de esta tesis, mediante el proyecto: “CO-ADMINISTRACION DE INHIBIDORES DE LA GLICOPROTEÍNA-P COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA EN EL TRATAMIENTO CONTRA LA EPILEPSIA”
– Convenio FONDECYT 095-2015.



ÍNDICE

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE CUADROS	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xix
INTRODUCCIÓN	xxi
HIPÓTESIS	xxiii
OBJETIVOS	xxiv
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO	1
1. EPILEPSIA	1
1.1. Definición	1
1.2. Epidemiología.....	1
1.3. Causas y tipos de epilepsia	2
1.4. Crisis convulsivas	3
1.4.1. Causas de una crisis convulsiva	3
1.4.2. Tipos de crisis	4
1.5. Epilepsia de lóbulo temporal (ELT)	6
1.5.1. Modelos animales para el estudio de la ELT	7
1.6. Síndrome epiléptico	8
1.7. <i>Estatus epiléptico (EE)</i>	8
1.8. Diagnóstico	8
1.9. Tratamiento farmacológico.....	9
1.9.1. Propósito del tratamiento	9
1.9.2. Medicación Antiepiléptica	10
1.9.3. Mecanismos de acción de los fármacos antiepilépticos.....	10
1.9.4. Fármacos utilizados	10
2. MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE EPILEPSIA.....	13

2.1. Modelo experimental de <i>estatus epiléptico</i> inducido por pilocarpina	15
3. GLICOPROTEÍNA-P	17
3.1. Estructura.....	18
3.2. Distribución de la Gp-P	19
3.3. Función	20
3.4. Sustratos de la Gp-P	20
3.5. Resistencia farmacoterapéutica	21
3.6. Epilepsia farmacorresistente	21
3.7. Inhibición de la Gp-P.....	22
3.8. Inhibidores de la Gp-P.....	23
3.8.1. Inhibidores de primera generación.....	23
3.8.2. Inhibidores de segunda generación.....	23
3.8.3. Inhibidores de tercera generación	24
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS	26
1. MATERIALES.....	26
1.1. Material biológico.....	26
1.1.1. Animales de experimentación.....	26
1.2. Material de Laboratorio	26
1.3. Reactivos	26
1.4. Equipos utilizados.....	27
1.5. Material de bioterio.....	27
2. MÉTODOS.....	27
2.1. Ambientación de bioterio	27
2.2. Inducción de <i>estatus epiléptico</i>	28
2.3. Determinación de los disolventes adecuados para la preparación de las soluciones stock.....	29
2.4. Determinación de la dosis mínima efectiva de fenitoína, para suprimir el <i>estatus epiléptico</i>	29
2.5. Diseño experimental	29
2.6. Preparación y administración de tratamientos	31
2.6.1. Preparación de tratamientos	31
2.6.1.1. Preparación de las soluciones stock de fenitoína.....	31

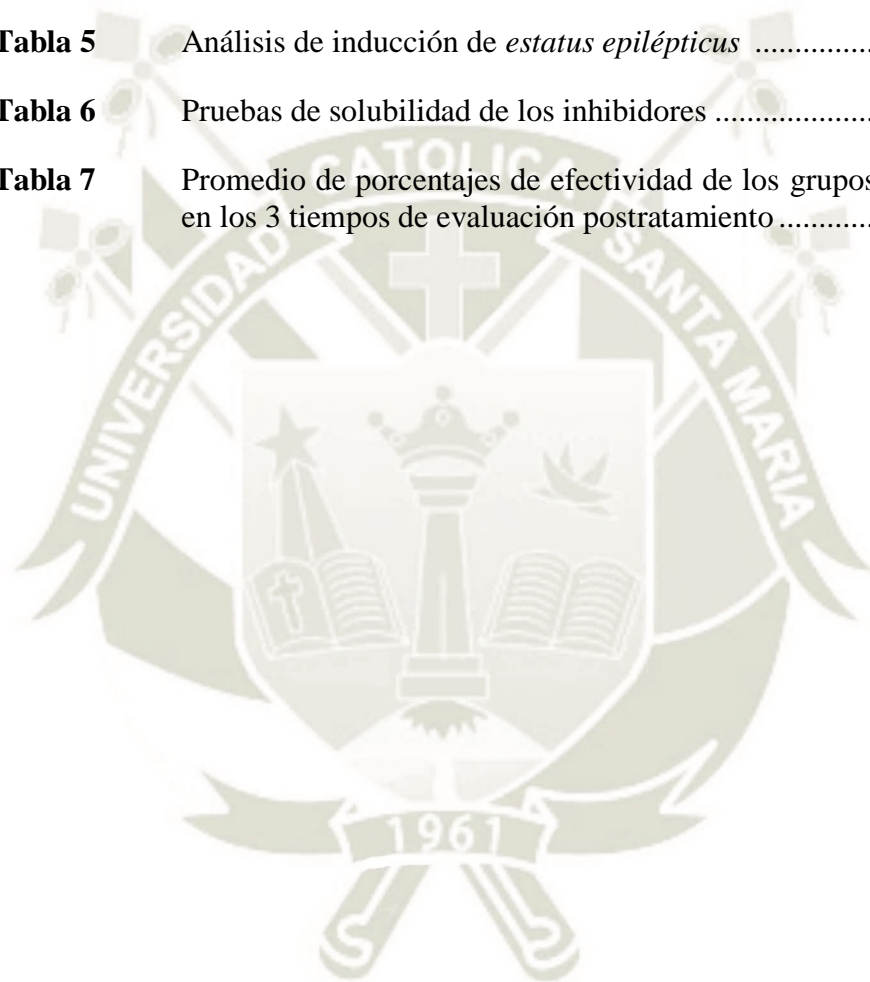
2.6.1.2.Preparación de la solución stock de elacridar.....	31
2.6.1.3.Preparación de la solución stock de tariquidar	32
2.6.1.4.Preparación del control positivo	32
2.6.1.5.Preparación del vehículo de administración.....	32
2.6.1.6.Preparación de las dosis de tratamientos para los diferentes grupos	32
2.6.2. Administración de los tratamientos	33
2.6.2.1.Evaluación de la respuesta terapéutica de los tratamientos en el estatus epilépticus	33
2.7. Análisis estadístico	35
2.7.1. Evaluación de la respuesta terapéutica presentada por el tipo de asociación 36	
2.7.2. Evaluación de la respuesta terapéutica presentada a los 15, 30 y 60 minutos post-administración.....	36
2.7.3. Evaluación de la respuesta terapéutica obtenida a los 30 minutos de evaluación postratamiento	36
2.7.4. Evaluación de los grupos de tratamientos administrados con mayor efectividad.....	37
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
1. Ambientación de Bioterio	38
2. Inducción de estatus epilépticus	38
3. Determinación de los disolventes adecuados para la preparación de las soluciones stock.....	40
4. Determinación de la mínima dosis efectiva de fenitoína, para suprimir el <i>estatus epilépticus</i>	41
5. Evaluación de la respuesta terapéutica de los tratamientos administrados en el <i>estatus epilépticus</i>	44
6. Evaluación de la respuesta terapéutica presentada por el tipo de asociación.....	47
7. Evaluación de la respuesta terapéutica presentada a los 15, 30 y 60 minutos post- administración	55
8. Evaluación de la respuesta terapéutica obtenida a los 30 minutos de evaluación postratamiento	58
9. Evaluación de los grupos de tratamientos administrados con mayor efectividad.	61
CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS	63
1. CONCLUSIONES.....	63

2. SUGERENCIAS	64
BIBLIOGRAFÍA.....	65
ANEXOS	71



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Tipos de tratamientos utilizados en el <i>estatus epiléptico</i>	30
Tabla 2	Tiempos de evaluación de la respuesta terapéutica	34
Tabla 3	Score de evaluación de la respuesta terapéutica.....	35
Tabla 4	Datos promedio del control de temperatura y humedad	38
Tabla 5	Análisis de inducción de <i>estatus epiléptico</i>	39
Tabla 6	Pruebas de solubilidad de los inhibidores	40
Tabla 7	Promedio de porcentajes de efectividad de los grupos experimentales, en los 3 tiempos de evaluación postratamiento	46

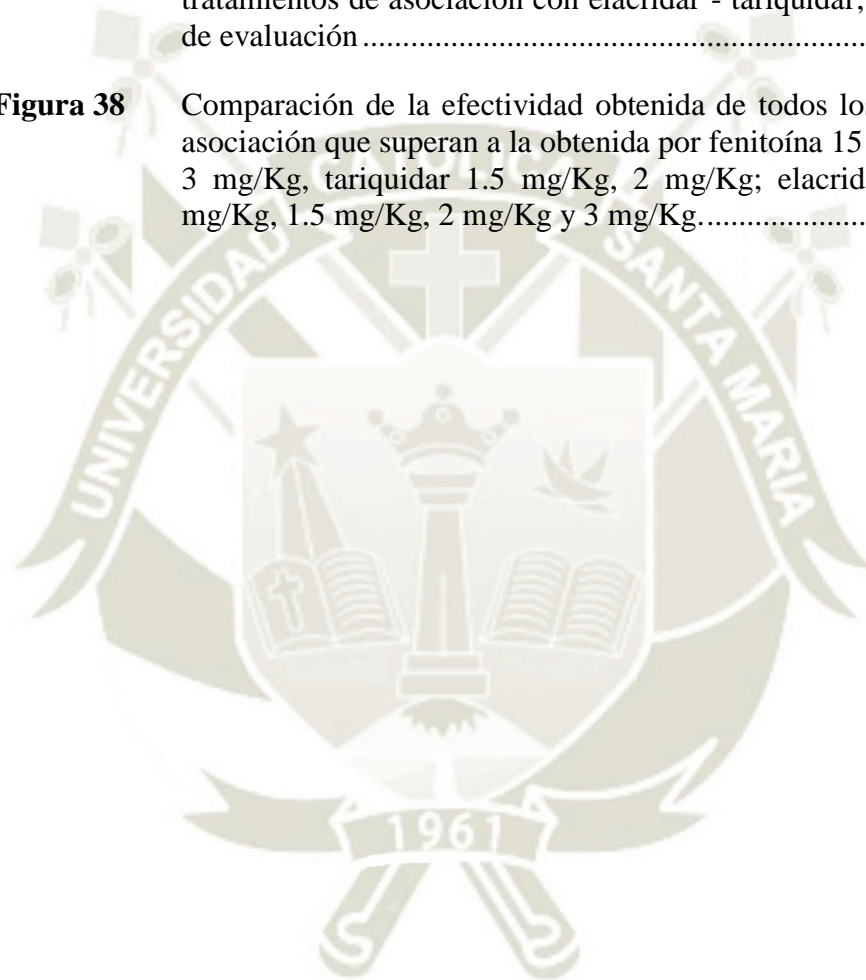


ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Frecuencia aproximada de las diferentes causas de epilepsia, desarrolladas en diferentes años	2
Figura 2	Localización de la actividad cerebral en las crisis focales	5
Figura 3	Localización de la actividad cerebral en las crisis generalizadas.....	5
Figura 4	Estructura del hipocampo humano	6
Figura 5	Estructura molecular de la fenitoína.....	11
Figura 6	Diferencias entre los modelos experimentales agudos y crónicos de epilepsia.....	14
Figura 7	Estructura molecular de la pilocarpina	16
Figura 8	Modelo de <i>estatus epiléptico</i>	17
Figura 9	Representación bidimensional de la Gp-P humana	18
Figura 10	Topografía de la forma de barril de la Gp-P humana.....	18
Figura 11	Gp-P en la barrera sangre-sistema nervioso central	19
Figura 12	Diagrama de Venn, que distingue el tipo de interacción con la Gp-P, que presentan distintos compuestos; inhibidores, sustratos e inductores	21
Figura 13	Estructura molecular de elacridar	25
Figura 14	Estructura molecular de tariquidar	25
Figura 15	Desarrollo del modelo experimental de pilocarpina.....	28
Figura 16	Signos y síntomas clínicos, presentados durante el <i>estatus epiléptico</i>	34
Figura 17	Comportamiento de las 5 dosis de fenitoína administradas, a los 15, 30 y 60 minutos de evaluación.	42
Figura 18	Porcentajes de efectividad de las 5 dosis de fenitoína a los 15 minutos de evaluación.	42
Figura 19	Porcentajes de efectividad de las 5 dosis de fenitoína a los 30 minutos de evaluación.	43
Figura 20	Porcentajes de efectividad de las 5 dosis de fenitoína a los 60 minutos de evaluación.	43

Figura 21	Porcentajes de efectividad del grupo control positivo (diazepam 4 mg/Kg) y tratamiento 1 (fenitoína 15 mg/Kg), a los 3 tiempos de evaluación.....	45
Figura 22	Porcentajes de efectividad de los tratamientos de por asociación de fenitoína y elacridar a los 15 minutos de evaluación.....	47
Figura 23	Porcentajes de efectividad de los tratamientos de asociación de fenitoína y elacridar a los 30 minutos de evaluación.....	48
Figura 24	Porcentajes de efectividad de los tratamientos de asociación de fenitoína y elacridar a los 60 minutos de evaluación.....	49
Figura 25	Porcentajes de efectividad de los tratamientos de asociación de fenitoína y tariquidar a los 15 minutos de evaluación.....	50
Figura 26	Porcentajes de efectividad de los tratamientos de asociación de fenitoína y tariquidar a los 30 minutos de evaluación.....	51
Figura 27	Porcentajes de efectividad de los tratamientos de asociación de fenitoína y tariquidar a los 60 minutos de evaluación.....	51
Figura 28	Porcentajes de efectividad de los tratamientos de asociación de fenitoína, elacridar - tariquidar a los 15 minutos de evaluación.....	53
Figura 29	Porcentajes de efectividad de los tratamientos de asociación de fenitoína, elacridar - tariquidar a los 30 minutos de evaluación.....	53
Figura 30	Porcentajes de efectividad de los tratamientos de asociación de fenitoína, elacridar - tariquidar a los 60 minutos de evaluación.....	54
Figura 31	Porcentajes de efectividad de los grupos control positivo (diazepam 4 mg/Kg) y el tratamiento 1 (fenitoína 15 mg/Kg), a los 15, 30 y 60 minutos de evaluación.	55
Figura 32	Porcentajes de efectividad de los grupos de tratamiento del primer tipo de asociación, de fenitoína con elacridar a sus distintas dosis, a los 15, 30 y 60 minutos de evaluación.	56
Figura 33	Porcentajes de efectividad de los grupos de tratamiento del segundo tipo de asociación, de fenitoína con tariquidar a sus distintas dosis; a los 15, 30 y 60 minutos de evaluación.	57
Figura 34	Porcentajes de efectividad de los grupos de tratamiento del tercer tipo de asociación, de fenitoína con elacridar - tariquidar a sus distintas dosis de 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 m/Kg cada una; a los 15, 30 y 60 minutos de evaluación.....	57

- Figura 35** Comparación de la efectividad obtenida de fenitoína 15 mg/Kg y los tratamientos de asociación con elacridar; a los 30 minutos de evaluación..... 59
- Figura 36** Comparación de la efectividad obtenida de fenitoína 15 mg/Kg y los tratamientos de asociación con tariquidar; a los 30 minutos de evaluación..... 60
- Figura 37** Comparación de la efectividad obtenida de fenitoína 15 mg/Kg y los tratamientos de asociación con elacridar - tariquidar; a los 30 minutos de evaluación 60
- Figura 38** Comparación de la efectividad obtenida de todos los tratamientos de asociación que superan a la obtenida por fenitoína 15 mg/Kg, elacridar 3 mg/Kg, tariquidar 1.5 mg/Kg, 2 mg/Kg; elacridar - tariquidar 1 mg/Kg, 1.5 mg/Kg, 2 mg/Kg y 3 mg/Kg..... 62



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Escala de Racine, modificada por Pinel y Rovner	34
-----------------	---	----



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Aprobación del Comité de Ética Institucional de investigación	71
Anexo 2	Ambientación de bioterio	75
Anexo 3	Sistema de videograbación	78



LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organización Mundial de la Salud
ILAE	Liga Internacional contra la Epilepsia
SNC	Sistema Nervioso Central
EEG	Electroencefalograma
ELT	Epilepsia de Lóbulo Temporal
EH	Esclerosis de Hipocampo
EMT	Esclerosis Mesial Temporal
ECA	Esclerosis del Cuerpo de Ammon
MRI	Resonancia Magnética Nuclear
<i>EE</i>	<i>Estatus epiléptico</i>
TAC	Tomografía axial computarizada
OPS	Organización Panamericana de la Salud
FAE	Fármacos antiepilépticos
PHT	Fenitoína
IV	Intravenosa
Gp-P	Glicoproteína - P
ATP	Adenosin tri-fosfato
ABC	ATP-Binding Cassette
NBDs	Dominios de union a nucleótidos
Tto	Tratamiento

RESUMEN

La epilepsia es el cuarto trastorno neurológico más común en el mundo, en la actualidad el 30% de los pacientes con epilepsia presentan resistencia a la terapia farmacológica, la cual es mayor en fármacos de primera línea como fenitoína; esto se podría deber a la acción de la Glicoproteína-P, que expulsa las sustancias xenobióticas al exterior de la célula, impidiendo así que el antiepiléptico alcance la concentración necesaria para suprimir las crisis epilépticas. Elacridar y tariquidar son fármacos inhibidores de la Glicoproteína-P de tercera generación, que se caracterizan por una acción rápida y específica. Es así que el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto anticonvulsivante de la asociación de fenitoína e inhibidores de la Glicoproteína-P (elacridar y tariquidar) en el *estatus epiléptico* en un modelo de epilepsia inducido por pilocarpina en ratas *Sprague-Dawley*.

Se trabajó con 123 animales de experimentación los cuales fueron divididos en 23 grupos: 5 Grupos (n=3 c/u) fueron utilizados para la determinación de la dosis mínima efectiva de fenitoína, la cual fue utilizada en todos los tratamientos de asociación con los inhibidores de la Glicoproteína-P; Grupo control diazepam 4mg/Kg (n=6), Grupo vehículo (n=6), Grupo positivo al cual se le administró la dosis mínima efectiva determinada de fenitoína (n=6), Grupos de Tratamiento 2, 3, 4, 5 y 6 a los cuales se les administro fenitoína con elacridar 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 mg/Kg (n=6 c/u) respectivamente, Grupos de Tratamiento 7, 8, 9, 10 y 11 a los cuales se les administro fenitoína con tariquidar 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 mg/Kg (n=6 c/u) respectivamente y Grupos de Tratamiento 12, 13, 14, 15 y 16 los cuales recibieron fenitoína con elacridar –

tariquidar a las dosis de 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 mg/Kg (de cada inhibidor) (n=6 c/u) respectivamente. Todos los tratamientos fueron administrados por vía intravenosa tres horas después de iniciado el *estatus epiléptico* y evaluados por un score de respuesta terapéutica a los 15, 30 y 60 minutos post-administración.

En el presente estudio se determinó como dosis mínima efectiva de fenitoína la dosis de 15 mg/Kg. A los 30 minutos de evaluación, todas las asociaciones mostraron porcentajes de efectividad superiores a los observados a los 15 y 60 minutos. Los tratamientos de asociación de fenitoína con elacridar 3 mg/Kg (110%), tariquidar 1.5 mg/Kg (102%) y 2 mg/Kg (99%); elacridar - tariquidar 1 mg/Kg (102%), 1.5 mg/Kg (102%), 2 mg/Kg (103%) y 3 mg/Kg (102%), presentan una efectividad estadísticamente superior a la obtenida por fenitoína 15 mg/Kg (83%). La asociación de fenitoína 15mg/Kg con un solo inhibidor, elacridar 3mg/Kg (110%) presenta la mayor efectividad; y de los tratamientos de asociación con ambos inhibidores las dosis de elacridar – tariquidar 1, 1.5, 2 y 3 mg/Kg presentan un efecto anticonvulsivante similar (102%, 102%, 103% y 102% respectivamente).

Se concluye que la asociación de fenitoína con ambos inhibidores de la Glicoproteína-P presenta un mejor efecto anticonvulsivante, siendo la asociación de fenitoína 15 mg/Kg con elacridar – tariquidar en dosis de 1 mg/Kg cada una, la mejor alternativa para el tratamiento del *estatus epiléptico* en ratas *Sprague-Dawley*.

Palabras claves:

Epilepsia, fenitoína, farmacoresistencia, Glicoproteína-P e inhibidores de la Glicoproteína-P.

ABSTRACT

Epilepsy is the fourth most common neurological disorder in the world, currently 30% of patients with epilepsy have resistance to drug therapy, which is higher in first-line drugs such as phenytoin; this could be due to the action of P-glycoprotein, which expels xenobiotic substances outside the cell, preventing the antiepileptic from reaching the concentration necessary to suppress epileptic seizures.

Elacridar and tariquidar are third generation P-glycoprotein inhibitor drugs, which are characterized by a quick and specific action. Thus, the present study aimed to evaluate the anticonvulsant effect of the association of phenytoin and P-glycoprotein inhibitors (elacridar and tariquidar) on *epileptic status* in a model of epilepsy induced by pilocarpine in *Sprague-Dawley* rats.

We worked with 123 experimental animals which were divided into 23 groups: 5 Groups (n = 3 per group) were used to determine the minimum effective dose of phenytoin, which was used in all treatments associated with the inhibitors of P-glycoprotein; Control group diazepam 4 mg/Kg (n = 6), Vehicle group (n = 6), Positive group to which the determined minimum effective dose of phenytoin was administered (n = 6), Treatment Groups 2, 3, 4, 5 and 6 to which administered phenytoin with elacridar 0.5, 1, 1.5, 2 and 3 mg/Kg (n = 6 per group) respectively; Treatment Groups 7, 8, 9, 10 and 11 were administered phenytoin with Tariquidar 0.5, 1, 1.5, 2 and 3 mg/Kg (n = 6 per group) respectively, and Treatment Groups 12, 13, 14, 15 and 16 which received phenytoin with elacridar - tariquidar at doses of 0.5, 1, 1.5, 2 and 3 mg/Kg (of each inhibitor) (n = 6 per group) respectively. All treatments were administered intravenously three hours after initiation of epileptic status and evaluated by a therapeutic response score at 15, 30 and 60 minutes post-administration.

In the present study the dose of 15 mg/Kg was determined as the minimum effective dose of phenytoin. At 30 minutes of evaluation, all associations showed higher effectiveness percentages than those observed at 15 and 60 minutes. The treatments of association of phenytoin with elacridar 3 mg/Kg (110%), tariquidar 1.5 mg/Kg (102%) and 2 mg/Kg (99%); elacridar - tariquidar 1 mg/Kg (102%), 1.5 mg/Kg (102%), 2 mg/Kg (103%) and 3 mg/Kg (102%), have a statistically higher effectiveness than the obtained by phenytoin 15 mg/Kg (83%). The association of phenytoin 15 mg/Kg with a single inhibitor, elacridar 3 mg/Kg (110%) has the highest effectiveness; and of the treatments of association with both inhibitors the doses of elacridar-tariquidar 1, 1.5, 2 and 3 mg/Kg have a similar anticonvulsant effect (102%, 102%, 103% and 102% respectively).

It is concluded that the association of phenytoin with both inhibitors of P-Glycoprotein has a better anticonvulsant effect, being the association of phenytoin 15 mg/Kg with elacridar - tariquidar in doses of 1 mg/Kg each of them, the best alternative for treatment of *epileptic status* in *Sprague-Dawley* rats.

Keywords:

Epilepsy, phenytoin, drug resistance, P-glycoprotein and P-glycoprotein inhibitors.