

FACULTAD DE CIENCIAS – FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS MENCIÓN
NEUROLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS EN LOS GENES *ABCB1* Y *ABCC2* EN
PACIENTES CON EPILEPSIA RESISTENTE A FÁRMACOS DEL POLICLÍNICO
DE NEUROLOGÍA DEL HOSPITAL CARLOS VAN BUREN**

JULIO CÉSAR RIQUELME ALCÁZAR

Proyecto de Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurología Celular y Molecular

Director de Tesis:

Prof. Dr. Pablo R. Moya

RESUMEN

La Epilepsia es un trastorno neurológico frecuente que afecta entre el 1 y 2% de la población general. Del total de los pacientes que son diagnosticados con epilepsia, aproximadamente el 25% de ellos no logran control de sus crisis pese al tratamiento con fármacos antiepilépticos; dicho fenómeno se conoce como epilepsia resistente a fármacos y su etiología se considera multifactorial. Una de las posibles causas es la presencia de bombas de expulsión a nivel de la Barrera Hematoencefálica, que actúan disminuyendo la concentración de fármaco activo en el sitio de interés, con niveles plasmáticos que pueden encontrarse normales. Dentro de los estudios se ha encontrado asociación genética entre la presencia de polimorfismos y la resistencia a fármacos, entre ellos *ABCB1* y *ABCC2*. Esto se ha asociado a pacientes con epilepsia resistente a fármacos en poblaciones Caucásicas y Asiáticas. En la población chilena, sin embargo, se desconocen estudios que determinen lo anterior. El objetivo de este trabajo es comprobar la hipótesis que señala que los pacientes con epilepsia resistente a fármacos presentan una distinta distribución genotípica de los polimorfismos en los genes mencionados, lo cual permitiría utilizarlos a futuro como potenciales biomarcadores de resistencia a anticonvulsivantes.

Palabras claves: epilepsia resistente a fármacos – polimorfismo- *ABCB1* – *ABCC2* – glicoproteína P

	Índice
Agradecimientos	5
Abreviaciones	6
Capítulo 1 – Introducción	7
Capítulo 2 – Marco Teórico	10
-2.1 Epilepsia	10
-2.2 Epilepsia Resistente a Fármacos	17
-2.3 Bases Fisiopatológicas de la Resistencia a Fármacos	20
-2.4 Hipótesis de Resistencia Farmacológica por Transportadores de Drogas	23
Capítulo 3 – Estado del Arte	29
-3.1 Farmacogenética de las Epilepsias	29
Capítulo 4 – Hipótesis y Objetivos	37
-4.1 Pregunta Clínica e Hipótesis	37
-4.2 Objetivos	38
Capítulo 5 – Materiales y Métodos	39
-5.1 Tipo de Estudio	39
-5.2 Población y Muestra	40
-5.3 Intervención	42
-5.4 Manejo Estadístico	44
Capítulo 6 – Resultados	45
-6.1 Resultados Generales	45
-6.2 Resultados Genotipificación	48
Capítulo 7 – Discusión	50
Capítulo 8 – Conclusiones	55
Referencias	56

Anexos

Anexo 1 – Tablas	65
Anexo 2 – Hoja de Información para pacientes y Consentimiento Informado	78

Agradecimientos

*A mis Padres por darme la oportunidad de estudiar mi profesión,
A mi Pareja Andrea por la tolerancia, paciencia, motivación y apoyo incondicional
durante los años de estudio y trabajo,
A mis Profesores por enseñarme y promover el desarrollo y perfeccionamiento de mis
capacidades,
A mi Profesor Guía, Pablo Moya, por darme la ayuda, cooperación y recursos necesarios
durante la investigación; sin su apoyo no habría sido posible su desarrollo,
Al Equipo del Laboratorio de Neurogenética de la Universidad de Valparaíso por la
asistencia con las técnicas de laboratorio,
Y finalmente a los Pacientes, sin ellos este trabajo no tiene sentido alguno.*

Listado de abreviaciones

- ABC: *Adenosine Triphosphate Binding Cassette*, Casete de Unión a ATP
- ADN: Ácido Desoxirribonucleico
- ARN: Ácido Ribonucleico
- ATP: *Adenosine Triphosphate*, Trifosfato de Adenosina
- AVAD: Años de Vida Ajustados en función de la Discapacidad
- BHE: Barrera Hemato-Encefálica
- CA1: Cornu Ammonis 1
- EEG: Electroencefalograma
- FAC: Fármaco Anticonvulsivante
- GABA: Ácido Gamma-Aminobutírico
- ILAE: *International League Against Epilepsy*, Liga Internacional contra la Epilepsia
- NBD: *Nucleotide Binding Domain*, Dominio de Unión a Nucleótido
- OR: Odds Ratio
- PCR: *Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la Polimerasa
- RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*, Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción
- SNC: Sistema Nervioso Central
- SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*, Polimorfismo de Nucleótido Único
- SV2A: Glicoproteína Sináptica Vesicular 2A
- TEC: Traumatismo Encéfalo Craneano
- TMB: *Transmembrane Domain*, Dominio Transmembrana

CAPÍTULO 1

Introducción

La Epilepsia es uno de los principales trastornos neurológicos que afecta a la población general, con una prevalencia estimada entre un 1 y 2% (1).

La epilepsia afecta aproximadamente a 50 millones de personas en el mundo. Corresponde a un problema importante de Salud Pública en el Mundo, que reduce los años de vida saludable en un grupo de pacientes socialmente productivos (1).

A pesar de los múltiples avances en la disponibilidad de fármacos anticonvulsivantes (FAC), se estima que un 20 a un 25% de los pacientes falla en alcanzar un adecuado control de crisis, pese al uso de uno o más fármacos, fenómeno que se conoce como epilepsia resistente a fármacos (2). La falta de respuesta a fármacos se configura como un grave problema en un importante grupo de los pacientes que la presentan, conllevando mayor disfunción social y neuropsiquiátrica, menor calidad de vida, mayores comorbilidades médicas y mayor riesgo de muerte (3). Dichas consecuencias pueden ser 2 a 10 veces mayor frente a la población de pacientes con epilepsia sin resistencia a fármacos y se relacionan inversamente con el control que se logre de las crisis (3).

No existen, a la fecha, biomarcadores de respuesta al tratamiento farmacológico que orienten a un mayor riesgo de resistencia a FACs. Es por lo anterior que el tratamiento de la epilepsia resulta complicado, pues existe nula predictibilidad de la eficacia de los fármacos utilizados, efectos adversos asociados al uso de éstos y un constante intento de alcanzar la dosis óptima para controlar las crisis. En ese sentido, existen estudios que indican la presencia de variantes genéticas asociadas a un mayor riesgo de resistencia.

En los estudios de genotipificación ha resultado promisorio la asociación de ciertos polimorfismos con la presencia de resistencia al tratamiento farmacológico en pacientes epilépticos, tanto en estudios aislados de población caucásica (Reino Unido e Irlanda) y Asiática (China e India), como también a nivel de meta-análisis de estudios (3). No obstante, cabe mencionar que no todas las investigaciones han demostrado una relación clara o positiva entre la presencia de polimorfismos y un mayor riesgo de resistencia. Los

principales motivos son variaciones de la población estudiada, los criterios diagnósticos y los fármacos con los cuales fueron tratados los pacientes.

Cabe destacar que se desconocen estudios de polimorfismos en población sudamericana con epilepsia refractaria. Por lo tanto, la importancia de la investigación en esta área se hace necesaria, dado el gran porcentaje de pacientes epilépticos que presentan resistencia a fármacos.

Debido a esta situación, se considera importante la búsqueda de nuevas formas para identificar precozmente a los pacientes que potencialmente desarrollarán epilepsia resistente a fármacos, así como también el descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos que sean susceptibles de intervención farmacológica.

En esta investigación proponemos evaluar la presencia de polimorfismos genéticos en pacientes con epilepsia resistente a fármacos y compararlos con un grupo control de pacientes con epilepsia respondedores a fármacos, a través de la búsqueda de polimorfismos de nucleótido único, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa asociada a Restricción de Longitud de Fragmentos de Polimorfismos, PCR-RFLP (*polymerase chain-restriction fragment length polymorphism*)

Nuestro propósito es encontrar marcadores genéticos que permitan la temprana estratificación del riesgo en los pacientes, separándolos entre pacientes con mayor o menor riesgo de resistencia, de manera de enfocar de distinta forma el estudio, seguimiento y tratamiento de éstos. Nuestra hipótesis es que existirá una distinta proporción de la distribución de los polimorfismos entre pacientes respondedores y resistentes al tratamiento, con mayor proporción de los polimorfismos de riesgo en los pacientes resistentes.

Realizaremos una evaluación clínica y genética de un grupo de pacientes con epilepsia, separándolos en pacientes respondedores y resistentes al tratamiento farmacológico. Esta investigación intenta caracterizar la presencia de los polimorfismos a evaluar en la población chilena de pacientes con epilepsia y determinar el potencial diagnóstico de la búsqueda de estas variaciones genéticas, correlacionándolas con la presencia de resistencia a fármacos. La identificación de marcadores de la evolución de los pacientes permitiría a los clínicos seleccionar de mejor forma el tratamiento farmacológico

o plantear desde el inicio del tratamiento la conducta intervencionista a realizar a futuro, con un seguimiento más estricto en los pacientes con elementos de riesgo.

CAPÍTULO 2

Marco Teórico

2.1. Epilepsia

La Epilepsia es una alteración que afecta al Sistema Nervioso Central (SNC) , específicamente a la corteza cerebral, caracterizada por la predisposición a tener crisis de epilepsia y a las consecuencias sociales, psicológicas, cognitivas y neurobiológicas de esta condición (4). Corresponde a uno de los trastornos neurológicos más frecuentes, afectando a personas de todas las edades, razas y clases sociales. La epilepsia afecta aproximadamente a 50 millones de personas en el mundo (1). En Chile, los datos de prevalencia al 2014 son de 10.8 a 17 por 1.000 habitantes y la incidencia de 114 por 100.000 habitantes por año (1). Corresponde a un problema importante de Salud Pública en el Mundo, representando el 0,5% de la carga mundial de enfermedad, medida en años de vida ajustados en función de la discapacidad (AVAD), y el 80% de esa carga corresponde a países en desarrollo (1).

La epilepsia no es un trastorno uniforme, sino que comprende muchos tipos diferentes de crisis y síndromes basados en etiologías heterogéneas (5). Crisis de epilepsia es la ocurrencia de síntomas y signos debidos a una actividad cerebral neuronal sincrónica excesivamente anormal (4). Estos síntomas y signos son repentinos y transitorios, y pueden incluir una amplia variedad de movimientos, sensaciones o alteraciones psíquicas acompañadas o no de alteración de la conciencia; de forma general los síntomas dependen del área cerebral de donde surge la descarga y de su generalización o no al resto de la corteza (Tabla 1). Las crisis se pueden clasificar en dos grandes categorías: focales y generalizadas (6). Las crisis focales (previamente conocidas como parciales) son conceptualmente originadas en redes limitadas a un hemisferio (6); en ellas, los cambios clínicos y electroencefalográficos iniciales indican la activación de un sistema de neuronas limitadas (8). Las crisis generalizadas son conceptualmente originadas en un punto y rápidamente involucran redes distribuidas de forma bilateral (6); en ellas, los cambios clínicos iniciales indican el compromiso de ambos hemisferios (8). La presentación clínica

depende de múltiples factores, entre ellos, el lugar del cerebro afectado (foco epileptógeno), la velocidad del desplazamiento de la descarga epiléptica a través del cerebro, la etiología de la epilepsia y la edad de la persona afectada (1).

Tabla 1: Clasificación de las crisis epilépticas*	
Modo de Inicio	Descripción
Focal	Sin compromiso de conciencia
	-Con componente motor observable: Motor focal sin marcha Motor focal con marcha (Jacksoniana) Motor focal versiva Motor focal postural Motor focal fonatoria
	- Con manifestaciones subjetivas sensitivas: Somatosensitivo Visual Auditivo Olfatorio Gustativo Vertiginoso
	-Con síntomas o signos autonómicos: Malestar epigástrico Palidez Transpiración Rubor Pilo-erección Dilatación pupilar Taquicardia
	-Con manifestaciones psíquicas: Disfásicos Dismnésicos Cognitivos Afectivos Ilusiones Alucinaciones estructuradas
	Con compromiso de conciencia (Discognitivo)
	Con Evolución a convulsión generalizada bilateral

Tabla 1: Clasificación de las crisis epilépticas*, <i>continuación.</i>	
Modo de Inicio	Descripción
Generalizada	Tónico-clónicas
	Mioclónicas
	Ausencias:
	Típicas
	Atípicas
	Atónicas

*Modificado de: (7).

Existen muchas causas de epilepsia y para organizarlas se dividen en causas genéticas, estructurales/metabólicas y desconocidas (6). En las epilepsias de causa genética la enfermedad es el resultado directo de un defecto genético conocido, en el cual las crisis se presentan como un síntoma central del trastorno (6) (previamente llamadas idiopáticas, en donde no se encontraba otra causa aparte de una posible predisposición hereditaria). Generalmente se definen por el inicio relacionado con una edad, las características clínicas, electroencefalográficas y la presencia de un estudio molecular específico (8). Las epilepsias de causa estructural/metabólica (previamente conocidas como sintomáticas) presentan una condición o enfermedad específica demostrada y que se ha asociado con un aumento substancial del riesgo de desarrollar crisis en estudios apropiadamente diseñados (6); en estos casos la epilepsia es considerada como consecuencia un trastorno del SNC (8). Ejemplos de este tipo incluyen al traumatismo encéfalo craneano, infarto cerebral y tumores cerebrales, entre otros. En las epilepsias de causa desconocida no se ha encontrado la naturaleza subyacente, pudiendo tener un defecto genético o ser consecuencia de otro trastorno no reconocido (6). El 60% de las personas con epilepsia no tiene etiología identificable (9). La enfermedad vascular representa un 15% y tumores un 6% (9). A medida que se aumenta la edad, la identificación de la causa es mucho más frecuente, llegando al 49% en enfermedades vasculares y tumores en un 11% (9).

El fenómeno fisiopatológico básico en las epilepsias consiste en una descarga brusca, excesiva e hipersincrónica de las neuronas (16). Desde el punto de vista neurofisiológico, esta hiperexcitabilidad neuronal se observa en registros intracelulares como un cambio paroxístico de depolarización brusca y sostenida del potencial de membrana, al que se agregan potenciales de acción de alta frecuencia (17). En su génesis,

participan cambios que se originan en la neurona como modificaciones a nivel sináptico, sistemas locales de sincronización sináptica y modificaciones en el medio extracelular determinadas por la actividad de las células gliales, las modificaciones en la distribución iónica, las variaciones en el pH y la disminución o aumento del espacio extracelular (17). La actividad epiléptica, por su parte, es capaz de inducir cambios neuronales plásticos permanentes a través de la activación de mecanismos de plasticidad neuronal que alteran la expresión de productos genéticos involucrados en el desarrollo axonal, la formación de sinapsis, la síntesis y liberación de neurotransmisores y la modulación de canales iónicos (16).

El diagnóstico de epilepsia es fundamentalmente clínico, basado en la historia clínica, la descripción del evento por testigos y la presencia de factores de riesgo para epilepsia (4). La definición de epilepsia requiere la presentación de por lo menos dos crisis de epilepsia sin desencadenante inmediato reconocible (Tabla 2) (4). Una crisis epiléptica es un síntoma y por sí sola no define un síndrome o enfermedad epiléptica. Del 2 a 4 % de la población general tiene en algún momento de su vida una crisis epiléptica (10). El concepto clínico y epidemiológico de la epilepsia como enfermedad exige la repetición crónica de crisis epilépticas y, de manera pragmática, se hace el diagnóstico cuando el paciente ha presentado dos o más crisis (4). El diagnóstico de epilepsia es positivo (no se puede hacer por exclusión) e incluye que las crisis son de naturaleza epiléptica, el tipo de crisis que presenta el paciente y un estudio etiológico.

Tabla 2: Criterios Diagnósticos de Epilepsia*
1.- Por lo menos dos crisis no provocadas que ocurren en una separación mayor de 24 horas entre ellas.
2.- Una crisis no provocada y la posibilidad de tener otras crisis similares al riesgo de recurrencia general después de dos crisis no provocadas (aproximadamente 60% o más).

* *Modificado de (6)*

La evolución y el pronóstico de la epilepsia depende de la causa, así como del precoz inicio del tratamiento y su continuidad (1). Se estima que hasta el 70% de las personas con epilepsia pueden llevar una vida normal si reciben el tratamiento apropiado

(11). El impacto que produce la enfermedad también depende de las características individuales de cada persona, asociándose a un aumento del riesgo de muerte prematura, principalmente en las personas con crisis de difícil manejo, siendo la mortalidad 2 a 3 veces mayor que la población general (11).

Para lograr control de las crisis, se necesita un adecuado tratamiento con FACs, los que deben proporcionarse en forma oportuna y continua, mientras el paciente lo necesite (Tabla 3). Dos tercios de las epilepsias activas se encuentran bien controladas por fármacos. El 20 a 25% restante, desarrolla epilepsia que resulta resistente a farmacoterapia (12).

Tabla 3: Fármacos Anticonvulsivantes *

Fármacos de Primera Generación	Fármacos de Segunda Generación	Fármacos de Tercera Generación
Fenobarbital (PB)	Lamogtrigina (LTG)	Lacosamida (LCM)
Fenitoína (FNT)	Levetiracetam (LEV)	Eslicarbazepina (ESL)
Primidona (PRM)	Topiramato (TPM)	Retigabina (RTG)
Etosuximida (ESM)	Oxcarbazepina (OXC)	
Carbamazepina (CBZ)	Vigabatrina (VGB)	
Ácido Valproico (AVP)	Zonisamida (ZNS)	
Clobazam (CLB)	Tiagabina (TGB)	
Clonazepam (CLN)		

**Modificado de (12)*

El uso de FACs debe ser personalizado, de acuerdo con el tipo de crisis, uso de otros medicamentos, comorbilidades asociadas, estilo de vida, preferencias personales y/o la relación con su familia y sus cuidadores (1). El tratamiento farmacológico de la esta patología implica una compleja interrelación entre el síndrome clínico, las características propias y la respuesta al uso de FACs que presentará el paciente (13).

El mecanismo de acción de los fármacos es conocido sólo parcialmente, siendo mejor en unos que en otros casos, y se resume en la Tabla 4 (19). El resultado final de todos los mecanismos es el de incrementar los potenciales inhibidores de descargas neuronales (12). Un conocimiento básico del mecanismo de acción es necesario para elegir una asociación racional entre ellos, evitando la asociación de fármacos con el mismo mecanismo de acción.

Tabla 4: Mecanismos de Acción de los Fármacos Anticonvulsivantes *								
Fármaco	Canales de Acción Voltaje Dependiente					Neurotransmisión		
	I NaT	I NaP	I Ca	I K	I H	GABA	Glu	Presináptico
<i>Fármacos que apuntan a los canales iónicos primariamente</i>								
Fenitoína	+	+	+	+				
Carbamazepina	+		+					
Oxcarbazepina	+		+					
Lamotrigina	+	+	+	+	+			
Ácido Valproico	+	+/-	+			+		
Zonisamida	+		+					
Etoxisimida	-	+	+	+				
<i>Mecanismo Mixto</i>								
Topiramato	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Fármacos que apuntan al metabolismo, liberación o receptores de neurotransmisores</i>								
Levetiracetam								+ (SV2A)
Fenobarbital			+			+		
Benzodiazepinas						+		
Vigabatrina						+		
Tiagabina						+		

*Adaptado de (19)

En general, el tratamiento farmacológico se inicia frente a una segunda crisis no provocada, y después de una primera crisis no provocada si existe una lesión en la neuroimagen, un déficit neurológico, actividad epileptiforme al electroencefalograma o riesgo inaceptable de otra crisis (14). Se recomienda que niños, adolescentes y adultos sean tratados con un solo fármaco (monoterapia) tanto como sea posible (1).

Los fármacos difieren unos de otros en dos aspectos fundamentales: en sus interacciones y en su perfil de efectos adversos. La interacción es la modificación del efecto de un fármaco debido a la acción de otro que se administra simultáneamente; los fármacos de segunda y tercera generación tienen muchas menos interacciones farmacológicas (12). La reacción adversa es el efecto nocivo, no intencionado, producido por un fármaco en dosis terapéuticas (12).

El objetivo del tratamiento farmacológico es conseguir el control total de las crisis sin producir efectos adversos; al elegir un fármaco se debe tener en cuenta el espectro de acción, los efectos adversos, las características farmacocinéticas y las potenciales alteraciones o interacciones con otros tratamientos (1).

Cerca de un tercio de los pacientes tienen menos de 1 crisis al año, un tercio tiene entre 1 y 12 crisis por año y el tercio restante tiene más de 1 crisis por mes (6). En un 20 a 44% de los sujetos con epilepsia existe una remisión espontánea de las crisis y cuando se inicia tratamiento, 2 de cada 3 pacientes logran la remisión total de las crisis a los 5 años; lo cual es similar si el tratamiento es iniciado con fármacos clásicos (Fenobarbital, Fenitoína, Carbamazepina o Ácido Valproico) o fármacos nuevos (como Lamotrigina, Levetiracetam o Topiramato) (15). No obstante, a pesar de los múltiples avances en la disponibilidad de fármacos, aún se estima que un 20 a un 25% de los pacientes falla en alcanzar un adecuado control de crisis pese al uso de uno o más fármacos, fenómeno que se conoce como epilepsia resistente a fármacos (2).

2.2. Epilepsia Resistente a Fármacos

La resistencia a los fármacos propone uno de los principales desafíos en el tratamiento farmacológico de las epilepsias. Para su definición la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE por sus siglas en inglés) ha propuesto la falla de dos intentos de fármacos bien tolerados y apropiadamente seleccionados para alcanzar la libertad de crisis (20). Corresponde a una situación crónica, frecuente, costosa e incapacitante, que representa un reto terapéutico e implica una aproximación integral y multidisciplinaria (21).

Se ha demostrado en múltiples grupos poblacionales que entre el 20-25% de los pacientes con epilepsia son resistentes a los fármacos (21); esta cifra varía en el tiempo y en distintos períodos de la enfermedad; así, en población escocesa se ha visto que cerca del 25% de los pacientes son farmacoresistentes y hasta un 16% fluctúa entre períodos libres de crisis, que duran más de un año, y recaídas (21). En el mayor registro prospectivo de pacientes que inician tratamiento farmacológico, que se lleva a cabo en Glasgow desde 1982, de un total de 1098 pacientes con diagnóstico reciente de Epilepsia, la tasa de remisión a los 5 años es de 68,3%, con un 61,5% en monoterapia y un 6,8 % en biterapia asociada; el resto se comportó como resistente a fármacos a pesar de múltiples cambios de esquemas (31).

La falta de respuesta a fármacos se configura como un gran problema en un importante grupo de los pacientes que la presentan. Se ha visto que la resistencia al tratamiento lleva a mayor disfunción social y neuropsiquiátrica, menor calidad de vida, mayor comorbilidad y mayor riesgo de muerte (3). Dichas consecuencias pueden ser 2 a 10 veces mayor frente a la población de pacientes con epilepsia sin resistencia a fármacos y se relacionan inversamente con el control que se logre de las crisis (22).

Los pacientes con epilepsia resistente tienen de dos a diez veces más riesgo de muerte prematura en comparación con la población general (3) (21). Este aumento significativo en la tasa de mortalidad está influido principalmente por el riesgo de muerte súbita inesperada en epilepsia (3). Las principales causas de fallecimiento de pacientes con resistencia a fármacos son producto de mayor incidencia de muerte súbita y un aumento del riesgo de suicidio (3).

La resistencia a fármacos también es una condición costosa. En Estados Unidos el coste general de la epilepsia se estima en 12.500 millones de dólares anuales, dentro de los cuales los costes directos, que representan alrededor del 25 % del total, se concentran en su gran mayoría en los pacientes con resistencia a fármacos (21). En España, el estudio ESPERA documentó un coste aproximado de 6.304 euros anuales para un paciente con epilepsia resistente a fármacos, en comparación con 4.146 euros anuales de un paciente con epilepsia controlada (21).

Existen múltiples factores de riesgo relacionados con la resistencia a fármacos; en una cohorte de 780 pacientes, se observó que el número de crisis (> 10) antes del inicio de los FAC, la historia familiar de epilepsia, el antecedente de crisis febriles, el traumatismo craneoencefálico como causa de la epilepsia, el consumo de drogas y la comorbilidad psiquiátrica, especialmente la depresión, eran los principales predictores de resistencia en epilepsia (23). El principal elemento clínico predictor de la evolución es la respuesta al primer fármaco, ya que la tasa de remisión de crisis, con un segundo fármaco, en pacientes con falla por efecto adverso es de un 42% versus la de remisión en aquellos por falta de eficacia, que sólo es de un 21% (30).

En general, en la epilepsia resistente a fármacos se observa, por una parte, que los pacientes con falla precoz al tratamiento tienen baja probabilidad de lograr control de las crisis al agregar otro fármaco, y sólo un pequeño número de pacientes logra retomar control de éstas al cambiar de fármaco (24). Por otra parte, la mayoría de los pacientes que responden al tratamiento lo hacen en dosis bajas a moderadas del compuesto (25); así, en general se ha visto que alrededor del 80% de los pacientes que responden a los fármacos lo hacen en la dosis mínima terapéutica, y sólo un pequeño porcentaje gana control con aumentos de dosis posteriores (29).

La decisión de considerar fallo terapéutico después de haber utilizado al menos dos tratamientos se fundamenta en estudios que han observado que la probabilidad de lograr la libertad de crisis disminuye significativamente según el número de medicamentos utilizados previamente (21). Se ha visto que aproximadamente el 47% de los pacientes se puede controlar con un solo medicamento, el 13% va a necesitar cambiar a un segundo fármaco para lograr el control de las crisis, y solamente un 4% se controlará con un tercer o la combinación de más de dos fármacos (21)

En los pacientes con epilepsia resistente a fármacos se puede observar tres grandes patrones de resistencia. En primer lugar, está aquella que es *de novo*, en donde se ha visto que la probabilidad de éxito de un nuevo fármaco no supera el 11% de los casos; en estos pacientes la respuesta al primer fármaco es altamente predictiva del desenlace terapéutico; de los pacientes que responden al primer medicamento, cerca del 61% puede lograr una remisión de la enfermedad, mientras que de los que presentan fallo terapéutico con el primer medicamento, solamente el 42% puede lograr la remisión (21). En segundo lugar, está aquella resistencia que es progresiva, que inicialmente es sensible al uso de antiepilépticos, pero se vuelve refractaria gradualmente; este tipo de evolución se observa en algunas epilepsias de la infancia y en los pacientes con esclerosis mesial hipocámpal (21). En tercer lugar, se encuentra la forma recurrente, en donde se alternan episodios de resistencia y control de crisis sin un claro gatillante (3); aunque los mecanismos implicados en este patrón de resistencia no son claros, se propone que los aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos de los medicamentos, así como las interacciones medicamentosas, pueden ser los responsables de este patrón de respuesta terapéutica (21). Es en el primer grupo donde se hace necesario encontrar formas de identificación precoz, para instaurar medidas complementarias al tratamiento farmacológico, que permitan lograr el control de las crisis.

2.3. Bases Fisiopatológicas de la Resistencia a Fármacos

La farmacoresistencia no es una condición exclusiva de la epilepsia y se ha reconocido ampliamente en otras enfermedades, como la depresión, la esquizofrenia, la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y muchas formas de cáncer. Desde el punto de vista biológico, se caracteriza por una insensibilidad a un gran número de medicamentos de amplio espectro, que actúan sobre diferentes receptores y a través de diferentes mecanismos (21). En general, se considera esta condición como el resultado de múltiples interacciones neurobiológicas entre variables relacionadas con la enfermedad de base, los fármacos y los aspectos genéticos propios de cada paciente. Las dos principales hipótesis frente al fenómeno de resistencia en epilepsia son la hipótesis del sitio de acción alterado y la hipótesis de los transportadores.

La hipótesis del sitio de acción plantea la posibilidad de que las alteraciones en el blanco farmacológico generan una reducción en su efectividad. Las principales dianas moleculares de los FAC son los canales iónicos dependientes de voltaje y receptores de los neurotransmisores GABA y Glutamato, así como también los transportadores y enzimas involucrados en la liberación, recaptura o metabolismo de éstos neurotransmisores. Múltiples fármacos comparten los mismos objetivos y a su vez actúan generalmente en más de uno (30).

Los canales de sodio dependientes de voltaje son los sitios de acción más investigados. Los primeros estudios evaluaron cambios en la función del canal y disminución de la sensibilidad a los fármacos en neuronas hipocampales CA1 de ratas epilépticas, en modelos de epilepsia del lóbulo temporal (inducida con pilocarpina) tratadas con carbamazepina (27). La modulación de las corrientes del canal de sodio por la carbamazepina se caracteriza por un cambio de la curva de inactivación hacia una dirección hiperpolarizada (31). El efecto bloqueador comprende una inactivación por enlentecimiento de la recuperación, que es dependiente de la actividad del canal rápido de sodio (31). Los primeros reportes clínicos de la reducción de los efectos moduladores de la carbamazepina fueron en pacientes con esclerosis mesial temporal, donde se observó que las neuronas hipocampales de CA1 sólo presentaban un 50% del efecto del fármaco en comparación con neuronas corticales de los mismos pacientes (31). En modelos animales también se ha visto

una disminución en la expresión de las subunidades beta1 y beta2 del canal de sodio en ratas resistentes (31). Uno de los mecanismos propuestos es que, ya sea por un cambio en la transcripción (que afectaría la expresión), o por un cambio en el procesamiento del ARN (que generaría subunidades mutantes por cambios en el patrón de *splicing*), se generan cambios en la composición (estequiometría) de las subunidades que componen el canal, o bien la incorporación de subunidades insensibles al fármaco (32).

De forma similar a los canales de sodio, también se ha observado una disminución de la actividad de agonistas del receptor GABA. En un modelo de pilocarpina se evidenció una disminución de la sensibilidad a fármacos que actúan en el sitio receptor 1 de benzodiazepinas (32); se ha postulado que ocurre un cambio transcripcional en la composición de subunidades del receptor GABA-A, en particular una disminución de la subunidad alfa-1 y aumento de la alfa-4 (32).

Por otra parte, también existen estudios que mencionan cambios en sitios de acción que no corresponden a canales iónicos, como por ejemplo la glicoproteína SV2A, que corresponde a un componente de las vesículas sinápticas y es el blanco de acción del fármaco levetiracetam; se ha observado una regulación a la baja de la expresión de esta proteína, en modelos de ratones con *estatus* epiléptico y en pacientes con esclerosis hipocámpal (28).

El principal mecanismo propuesto para la hipótesis del sitio de acción es una alteración coordinada de la transcripción, debido a las convulsiones, en un grupo de genes que codifican subunidades de los canales, y que pareciera ser regulado de forma diferente en distintos tipos de neuronas (32). Estos cambios transcripcionales se presume que afectan la densidad de canales en la membrana, así como la estequiometría de las subunidades en los complejos de canales con múltiples subunidades (32). Además de los efectos mencionados, la actividad convulsiva provocaría modificaciones post-traduccionales, como fosforilación o glicosilación de las proteínas que afectarían el transporte hacia la membrana y/o su función. En ese sentido, se han visto cambios en la sensibilidad de canales de sodio al topiramato, en modelos con ratones, en donde se ha detectado mayor activación de la proteína quinasa C que fosforila el asa intracelular entre los dominios I y II de las subunidades Alfa del canal de Sodio (27) (101).

Sin embargo, la mayoría de los estudios que apoyan esta hipótesis han descrito efectos de los fármacos en preparaciones *in vitro* de modelos animales de epilepsia o en estudios de expresión de proteínas en muestras obtenidas de pacientes epilépticos, y no se objetivó necesariamente la eficacia o resistencia de los fármacos. También se debe mencionar que la mayoría de los trabajos evalúan pacientes o modelos de epilepsia del lóbulo temporal, y son escasos los estudios con otros tipos de epilepsias (27).

2.4. Hipótesis de Resistencia Farmacológica por Transportadores de Drogas

El hecho de que la resistencia surja frente a una amplia variedad de fármacos con distintos mecanismos de acción, sugiere un mecanismo de acción no específico que contribuya a la resistencia (33). Entre las distintas posibilidades de resistencia, un mecanismo que surge desde el estudio de la resistencia en pacientes con cáncer, como elemento común el uso de distintos fármacos, corresponde al fallo de la llegada al tejido encefálico, producto de transportadores de flujo de salida (33). Uno de los principales argumentos a favor de esta posición es el hecho que la resistencia ocurre en una gran variedad de fármacos con distintos mecanismos de acción en un mismo paciente, lo cual sugiere que se produce un fenómeno no específico que limita la efectividad de todos los tratamientos (34). En esta línea de trabajo, se ha planteado un rol para los transportadores de la Barrera Hemato-Encefálica (BHE), los cuales impedirían el correcto alcance de una concentración adecuada de fármaco en el tejido blanco, pese a un adecuado nivel plasmático de éste, al existir una mayor función de los transportadores a nivel de la BHE, en astrocitos y en neuronas. Dicha hipótesis explicaría por qué un gran número de medicamentos, a pesar de ser liposolubles y con una alta difusión al SNC, presenten una baja eficacia (21, 33).

Los fármacos que se usan para tratar las patologías del SNC deben tener la capacidad de penetrar al sitio de acción. El ingreso de éstos al cerebro depende de múltiples factores, que incluye las barreras físicas presentes, como la BHE, y la afinidad del sustrato frente a distintos mecanismos de transporte presentes en esta interfase (35). Esta barrera excluye sustancias tóxicas y protege a las neuronas de neurotransmisores circulantes (36). Por una parte, la exclusión selectiva se realiza principalmente por las propiedades anatómicas especializadas de las células endoteliales, que limitan la difusión pasiva de sustancias solubles en agua desde la sangre al compartimiento intersticial y cerebrospinal (36). Por otra parte, para controlar la homeostasis del SNC se expresan transportadores en la barrera, que mantienen los gradientes de las moléculas orgánicas, metabolitos y nutrientes a través de la BHE (37).

La BHE está compuesta principalmente por las células endoteliales que están envainadas por la lámina basal, que a su vez se encuentra rodeada, en el compartimento

abluminal, por pericitos y los pies terminales de los astrocitos (37). A nivel microscópico, las células endoteliales se encuentran firmemente vinculadas a través de uniones celulares especializadas, las uniones estrechas (TJ, por su nombre en inglés *tight junctions*) y las uniones adherentes (AJ, por su nombre en inglés *adherens junctions*) (36). Dentro de sus características, estas células destacan además por carecer de fenestraciones (a diferencia del endotelio del resto del sistema vascular) y presentar una muy baja tasa de endocitosis (37). La presencia de las uniones celulares otorga también una alta resistencia eléctrica transendotelial, lo que limita el paso de una gran mayoría de moléculas a través de la BHE (37). Para poder traspasar la BHE, las moléculas deben tener un bajo peso molecular (< a 500 Da) o una característica lipofílica intrínseca, de manera de poder utilizar la vía paracelular (37).

A nivel de la BHE los capilares cerebrales restringen la penetración de compuestos, entre éstos destacan aquellos que son hidrofílicos, polares y los unidos a proteínas; sin embargo, los que son apolares y liposolubles la traspasan fácilmente (38). El transporte a nivel de la BHE y a nivel de la Barrera Hemato-Cerebro-Espinal es, así, el resultado de múltiples mecanismos de entrada (desde el compartimiento intravascular al intersticial) y salida (de vuelta al compartimiento intravascular). Entre estos últimos, destacan los Transportadores de Solutos y la familia de transportadores ABC (del inglés *Adenosine Triphosphate Binding Cassette*) (39). Los transportadores ABC son un grupo de proteínas transmembrana que utilizan la energía de la hidrólisis del ATP (adenosin trifosfato) para transportar a un amplio sustrato de productos, ubicados principalmente a nivel de interfases biológicas, operando en contra de la gradiente de concentración de las sustancias (33) (39). Se considera que los transportadores funcionan como un mecanismo de defensa contra las sustancias lipofílicas exógenas que logran atravesar fácilmente la BHE (38).

Los transportadores ABC fueron inicialmente descritos en estudios de células tumorales, posterior a la observación de resistencia cruzada a múltiples drogas con distintos mecanismos, a los cuales no habían sido expuestas (37). Las proteínas transportadoras del complejo ABC tienen 3 grandes funciones. En primer lugar, limitan la entrada al cuerpo sustancias ingeridas por la vía oral (a nivel intestinal). En segundo lugar, promueven la eliminación a través de la bilis y orina de las sustancias que ya se encuentran dentro del compartimiento intravascular. En tercer lugar, disminuyen la entrada de sustancias

xenobióticas (externas al organismo) a tejidos sensibles, tales como cerebro, gónadas, linfocitos y circulación fetal (40). Cabe destacar que, en general, son elementos “promiscuos”, con una amplia variedad de sustratos, donde un sustrato común corresponde a un elemento de gran tamaño (peso molecular mayor a 400 KDa), hidrofóbico, anfipático y con una carga positiva débil a pH fisiológico (34).

Los transportadores ABC son moléculas con múltiples subunidades, que contienen un factor citoplasmático esencial con actividad hidrolítica del ATP (41). Se caracterizan por la presencia de un asa de unión al fosfato (“asa P”) y una secuencia corta de consenso de residuos LSGGQ (7). Estos transportadores se clasifican en exportadores e importadores, siendo los primeros los únicos presentes en eucariontes (41). Están caracterizados por cuatro dominios funcionales: dos dominios de unión a nucleótidos (NBD por sus siglas en inglés *nucleotide binding domain*) y dos dominios transmembrana (TMB por sus siglas en inglés *transmembrane domain*). El dominio NBD es la característica esencial de esta familia de transportadores (41); a su vez, el dominio TMB es el que posee los sitios de unión al sustrato y forma el poro transmembrana (37). Los dominios NBD se encuentran en la parte interna, que mira hacia el citoplasma de la célula; al unirse dos moléculas de ATP se produce una dimerización de los dominios NBD, lo que produce un cambio del dominio TMB a una conformación que mira hacia el extracelular, produciendo la salida del sustrato unido (41).

En este contexto surge el potencial rol de varias proteínas del complejo, entre ellas la Glicoproteína P, la cual se encuentra entre las proteínas transportadoras ABC. Esta proteína conforma un elemento importante de la BHE, participando activamente del transporte de sustancias fuera del endotelio cerebral (39). Los sustratos para esta bomba son amplios, e incluyen nutrientes, aminoácidos, azúcares, péptidos, pigmentos, metales y fármacos (33). En los seres humanos, la glicoproteína P se encuentra codificada por el gen *ABCBI*, ubicado en el cromosoma 7q21.1. La proteína tiene 1280 aminoácidos y una masa molecular de 170 kDa (34). El principal patrón de expresión de la Glicoproteína P es a nivel de zonas de interfases biológicas, lo cual sugiere fuertemente que juega un rol en la protección del organismo frente a agentes externos, estableciéndose una función pivotante en la farmacocinética y disposición de las drogas (34).

Estudios inmunohistoquímicos en roedores y seres humanos han demostrado la presencia de la glicoproteína P a nivel celular en el endotelio capilar de la BHE y en células epiteliales del plexo coroideo: a nivel luminal del endotelio y en caveolas (elementos transcelulares de ingreso de sustancias); a nivel de astrocitos, en los procesos de sus pies terminales (endfeet processes); a nivel de neuronas y microglia en situaciones patológicas (astrocitomas, Tuberculosis, leptomeningitis y encefalitis) y a nivel intracelular, en vesículas, donde se ha sugerido un rol en el secuestro de drogas (39).

Los transportadores multi-drogas pueden contribuir a la resistencia en el cerebro de dos formas. Primero, a través de su expresión constitutiva en la BHE, restringen el ingreso a muchos fármacos y también aumentan la expulsión de las drogas desde el parénquima cerebral (35); y en segundo lugar, por un aumento de función (por aumento de su actividad y/o su expresión), ya sea intrínseca o adquirida, que puede limitar la penetración de los fármacos a través del a BHE (35).

El primer estudio en sugerir una relación con la resistencia a FACs fue realizado por Tishler y colaboradores; en él se estudió el tejido de 19 pacientes con epilepsia resistente a fármacos (con distintas etiologías focales tales como esclerosis hipocampal, astrocitomas, gangliogliomas y cavernomas) y se evaluó la expresión del gen *ABCB1*, a través de PCR cuantitativa, y la presencia de Glicoproteína P por inmunohistoquímica. Se evidenció un aumento de expresión de *ABCB1* en 11/19 y un aumento de la tinción de la proteína en 14/19 pacientes; además observaron una notoria disminución de la concentración intracelular de Fenitoína en tejidos celulares de pacientes con los hallazgos previos de aumento de *ABCB1* y Glicoproteína P (43).

En modelos animales se ha observado que en epilepsia posterior a *estatus* epiléptico inducido por actividad eléctrica a nivel de amígdala basolateral, las ratas con resistencia a fenobarbital mostraban mayores niveles de expresión de glicoproteína P, determinado por inmunohistoquímica a nivel de corteza piriforme, giro dentado y CA1, específicamente en los microvasos endoteliales de la BHE (44). Adicionalmente, en estudios de microdiálisis *in vivo* en modelos animales, se ha logrado establecer que existe una variación en la concentración de Fenitoína, Carbamazepina, Fenobarbital y Lamotrigina tras la administración de un sustrato de la glicoproteína P que actúa como inhibidor competitivo (35). En estudios con ratones deficientes (*knockout*) del gen *ABCB1*, también se ha

observado un aumento de concentraciones farmacológicas de Fenitoína, Carbamazepina, Fenobarbital y Lamotrigina (30). Posteriormente se obtuvo resultados positivos al administrar inhibidores farmacológicos de la Glicoproteína P en modelos de ratones con epilepsia resistente a fenobarbital, en donde se observó una disminución de las crisis, posterior al uso de taquiridar (45).

Dentro de la familia de los transportadores ABC también se encuentra la proteína MRP2 o ABCC2, con similares funciones que la Glicoproteína P. Inicialmente se describió en modelos animales en ratas y en pacientes con el síndrome de Dubin-Johnson, los cuales presentan hiperbilirrubinemia conjugada hereditaria leve, debido a una disminución de esta proteína a nivel de la membrana canalicular del hepatocito, donde media la excreción de las moléculas de bilirrubina (46). Similar al resto de los transportadores ABC, también presenta un amplio sustrato de sustancias tales como fármacos anti-cáncer, antivirales, antibióticos y anticonvulsivantes, entre ellos, Carbamazepina y Ácido Valproico (46); a su vez también presenta una distribución amplia en el organismo, en zonas de interfase, tales como hígado, riñón, intestino delgado, BHE y capilares del SNC (47). En los seres humanos se encuentra codificada por el gen *ABCC2*, localizado en el cromosoma 10q24.2 (47).

El primer estudio en sugerir una relación con la resistencia a fármacos en epilepsia fue realizado por Vogelgesang, en donde se describe la expresión de transportadores en tumores disembrionales neuroepiteliales; en la investigación se describe la expresión de varios transportadores en tejidos biopsiados de 14 pacientes con epilepsia resistente a fármacos, comparándolos con 9 muestras de tejidos de pacientes con malformaciones arteriovenosas sin epilepsia (48). En el estudio se describe un aumento de la expresión de *ABCC2*, junto con *ABCB1*, *MRP5* y *BCRP*, principalmente a nivel del endotelio de los vasos sanguíneos, en comparación con las muestras controles, a través de inmunohistoquímica (48).

En modelos animales, a través de microdiálisis *in vivo*, se observó una relación entre la administración de inhibidores de *ABCC2* y un aumento de la concentración tisular de Fenitoína, a nivel cortical frontal, así como también se observó el mismo fenómeno en ratas *knockout* para el gen *ABCC2* (49). Posteriormente se utilizó un modelo de epilepsia a través de *kindling* a nivel de amígdala basolateral, y se observó el efecto anticonvulsivante del

tratamiento con fenitoína en presencia o no de un inhibidor de ABCC2, como resultado se describe un aumento del efecto anticonvulsivante, con un incremento del umbral de las crisis de un 90%, sin cambios de la concentración plasmática del fármaco (49).

No obstante, cabe destacar que la mayoría de estos estudios tomaron tejido de lesiones epileptogénicas (tumores, esclerosis hipocampal), y por otro lado aparece la duda sobre si los datos de modelos animales de epilepsia pueden ser extrapolados a pacientes humanos. Por ello, surge la interrogante si es que los hallazgos en estos estudios se pueden aplicar a pacientes con epilepsia resistente sin una clara lesión estructural causante de la patología. Es en esta línea que surgen los primeros estudios que plantearon variaciones a nivel genético que pudieran conferir un cambio en su función.

CAPÍTULO 3

Estado del Arte

3.1. Farmacogenética de las Epilepsias

La variabilidad inter-individual en la respuesta a fármacos es un fenómeno conocido y supone un problema importante en la medicina moderna (50). A pesar de los múltiples avances en el diagnóstico y tratamiento de la Epilepsia, su enfrentamiento sigue siendo principalmente empírico y la prescripción racional, adaptándose a las características particulares del paciente, generalmente no es posible a un nivel individual (51).

Actualmente no existen biomarcadores categóricos que ayuden a predecir qué grupo de pacientes responderá adecuadamente, qué grupo no responderá y qué grupo sufrirá de reacciones adversas idiosincráticas (50). De esta forma, los tratantes tienden a optimizar la dosis del tratamiento de un paciente individual a través de ensayo y error, lo cual puede ser contraproducente para muchos pacientes (50). A pesar de que muchos factores contribuyen a la variabilidad del *outcome* clínico en un paciente individual, parte de lo impredecible de las respuestas puede resultar, en alguna proporción, producto de la variabilidad genética (26).

La influencia de los genes en el resultado de los tratamientos farmacológicos es un campo rápidamente creciente, denominado Farmacogenética (término acuñado por el genetista alemán Friedrich Vogel en 1959), y su objetivo final es utilizar el *background* genético de un individuo para predecir la respuesta, eficacia y potenciales efectos adversos de un fármaco en él (26). Dentro de este tema, el concepto de medicina personalizada está recibiendo mucha atención, y se ha creado mucha expectativa en la farmacogenética como una herramienta importante para optimizar el tratamiento de las epilepsias a nivel individual (26).

La historia de la farmacogenética se puede remontar hasta el año 500 AC, cuando Pitágoras describió que la ingesta de la semilla de la Haba resultaba en una reacción potencialmente fatal en algunas familias de individuos, pero no en la mayoría (desarrollo de anemia hemolítica en individuos con defecto en la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) (52). Desde entonces, se ha acumulado una importante cantidad de

observaciones y estudios que han estructurado el campo de estudios. Con la excepción de los genes ligados al sexo (en los cromosomas X e Y), cada individuo posee dos copias de cada gen que posee. En una población dada, no todas las copias de un gen presente pueden no tener la misma secuencia de nucleótidos; a esta variación se le denomina polimorfismo, y estos polimorfismos contribuyen a la variabilidad observada en la población estudiada (53). De esta forma, los polimorfismos genéticos surgen como un elemento de potencial rol en la variabilidad en la farmacocinética y farmacodinámica de los fármacos (26).

Los polimorfismos corresponden a variaciones en la secuencia de ADN, y los polimorfismos de nucleótido único (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*), son las formas más frecuentes de variación en el genoma humano (26). Corresponden a pares de bases únicas en donde existen secuencias alternativas (alelos) en individuos normales de la población, donde el alelo menos encontrado tiene una frecuencia de al menos un 1% de la población general (55). Cuando los alelos de un particular *locus* genético son idénticos, se denomina la presencia de un estado homocigótico; la situación contraria donde existen diferentes alelos en el mismo *locus* es conocida como heterocigoto. Se estima que los SNP ocurren en alrededor de uno cada 1000 pares de bases, aunque pueden variar tanto como 100 veces alrededor del genoma humano (55). Los SNP se encuentran dentro de todo el genoma, incluyendo promotores, exones e intrones, pero dado que menos del 5% del genoma de una persona es codificante, la mayoría de éstos son encontrados en regiones no codificantes (55). Aunque sea silente, la ocurrencia de un SNP puede afectar la funcionalidad de una proteína, ya sea alterando su tasa de síntesis, estabilidad del ARN mensajero o el procesamiento del mismo(26).

Los principios farmacológicos involucrados en el uso clínico de los FAC proveen una base lógica para el diseño de estudios genéticos; en general hay dos grandes grupos de genes que se han estudiado. Por un lado, están aquellos que codifican proteínas que son blancos para los fármacos en uso, tales como canales iónicos, enzimas sintetizadoras/degradadoras de neurotransmisores y proteínas relacionadas con la recaptura de neurotransmisores (56). El principal problema con este enfoque es que, a la fecha, sólo conocemos de forma parcial el mecanismo de acción exacto de los FAC, y es desconocida la extensión en la que los efectos mínimos o desconocidos de los FAC puedan estar influyendo en su efectividad clínica (56), por lo que elegir genes basados sólo en el

mecanismo de acción principal de los FAC no es comprensivo y puede fallar en identificar variaciones de genes relevantes. Por otro lado, existe un segundo grupo de genes candidatos, y son aquellos que se relacionan con las proteínas que afectan la farmacocinética de los FAC; de esta forma, genes que codifican proteínas que determinan los niveles circulantes o acceso a sitios terapéuticos de los FAC deben ser estudiados para tener un enfoque global de la situación (8). Dentro de este grupo de moléculas se encuentran los transportadores, específicamente la familia de transportadores ABC, las cuales, como se ha comentado previamente, facilitan la salida de sustancias exógenas a través de interfaces de membranas, tales como la BHE (56).

El gen humano *ABCB1* se encuentra en el cromosoma 7, está compuesto de 29 exones, posee un largo total del ADN complementario de 4.669 pares de bases y codifica la Glicoproteína P (57). Se han identificado diversos SNPs en este gen, y en general la frecuencia alélica para la mayoría de los que se encuentran en la región codificante es baja, a excepción de tres, ubicados en el exón 12 (1236C>T *rs1128503*), 21 (2677G>T/A *rs2032582*) y 26 (3435C>T *rs1045642*); De éstos, *rs1045642* fue la primera variante genética que se ha asociado a una modificación funcional en células de tracto intestinal, a pesar que el SNP no modifica la secuencia aminoacídica normal (58). En aquella investigación se observó que los individuos con el genotipo CC presentaban una expresión de la Glicoproteína P dos veces mayor en comparación con los individuos que presentaban el genotipo TT, lo cual se asoció a disminuciones significativas en las concentraciones plasmáticas de Digoxina (sustrato de la Glicoproteína P) posterior a la ingesta oral (58). Existen dos probables explicaciones para el cambio funcional que ocurre con la presencia del SNP, por una parte, se ha establecido que hay un desequilibrio de ligamiento con otro SNP en el exón 22 (2677G>T/A) el cual es no sinónimo, lo que significa que el cambio en la secuencia de nucleótidos produce un cambio en la secuencia amininoacídica (Ala893Ser ó Ala893Trp) lo cual explicaría el cambio funcional (57). Pero por otra parte, se ha observado que a pesar de ser un polimorfismo sinónimo, si hay un cambio en el codón que se utiliza, de ATC a ATT (ambos codifican Isoleucina), y en modelos celulares transfectados HeLa, en donde se ha incluido el SNP a través de vectores con la secuencia de ADN modificada, existe una alteración de la especificidad del sustrato de la Glicoproteína P, lo cual puede alterar el funcionamiento normal (59).

Las primeras investigaciones exitosas en epilepsia fueron relacionadas con el polimorfismo silente C3435T (*rs1045642*). El primer estudio publicado encontró una mayor proporción de pacientes resistentes en individuos con el genotipo CC (60). En aquel estudio se comparó dos cohortes de pacientes caucásicos del Reino Unido con epilepsia de distintas etiologías, separándolos en resistencia o respuesta al tratamiento farmacológico con diversos FAC; la presencia del genotipo CC confería un OR (Odds Ratio) 2.66 al comparar los grupos de pacientes (60). Desde entonces se han publicados múltiples estudios que han tratado de replicar el hallazgo en distintas poblaciones de pacientes con epilepsia resistente a fármacos (Tabla 5). En general se han visto distintos resultados, con algunos estudios que han encontrado una asociación positiva del SNP con la resistencia a fármacos, pero en otros no se ha logrado establecer relación alguna; incluso en población asiática se ha visto una relación inversa, en donde el genotipo TT se ha encontrado con mayor frecuencia en pacientes con resistencia a fármacos (64) (67).

Tabla 5: Resultados de estudios que han investigado la relación del polimorfismo C3435T (*rs1045642*) del gen *ABCBI* en la respuesta a FAC

Autor	Año	Población	Resistentes	Respondedores	Resultado
Siddiqui	2003	Reino Unido	200	115	CC>TT OR 2.66
Soranzo	2004	Reino Unido	280	136	CC>TT OR 4.5
Zimprich	2004	Austria	123	87	C>T OR 4.67
Tan	2004	Australia	401	208	No significativo
Seo	2006	Japón	126	84	TT>CC OR 3.64
Chen	2007	China	50	164	No significativo
Hung	2007	China	114	213	CC>TT OR 3.62
Kwan	2007	China	221	297	TT>CC OR 2.5
Shahwan	2007	Irlanda	122	233	No significativo
Dericioglu	2008	Turquía	89	100	No significativo
Ozgon	2008	Turquía	44	53	No significativo
Szoeke	2009	Australia	63	148	No significativo
Szoeke	2009	Escocia	133	152	No significativo
Szoeke	2009	China	11	34	No significativo
Ufer	2009	Alemania	188	103	No significativo
Lakhan	2009	India	94	231	No significativo
Vahab	2009	India	113	54	No significativo
Kim	2009	Corea	198	193	No significativo
Alpman	2010	Turquía	39	92	No significativo
Grover	2010	India	87	125	No significativo
Sanchez	2010	España	111	178	No significativo

Haerian	2011	Asiática	323	362	No significativo
Di Q	2011	China	91	79	No significativo
Dong	2011	China	157	193	No significativo
Kumari	2011	India	125	260	No significativo
Sayyah	2011	Irán	132	200	CC>TT OR 2.17
Emich-Widera	2013	Polonia	60	25	No significativo
Emich-Widera	2014	Polonia	193	135	No significativo
Saygi	2014	Turquía	59	60	No significativo
Seven	2014	Turquía	69	83	No significativo

Fuente: Elaboración propia en base a los estudios mencionados

En relación a los estudios las principales diferencias se establecen, en primer lugar, en los criterios de inclusión de los pacientes y las características de éstos, donde es observable una tendencia a la inclusión de pacientes con etiologías múltiples, con una alta proporción de pacientes con epilepsia secundaria a lesiones estructurales y también a pacientes con epilepsia del lóbulo temporal secundaria a esclerosis mesial temporal; ambas etiologías con reconocido perfil de alta resistencia a fármacos, por características propias del tejido epileptógeno y sin una clara relación causal con la expresión de transportadores. También existen investigaciones donde se incluyen pacientes donde se ha realizado cirugía de la epilepsia con mala evolución, lo cual aumenta la heterogeneidad de los estudios a la hora de comparar resultados o considerar sus hallazgos significativos. En segundo lugar, también se debe comentar que no todos los estudios describen los fármacos utilizados por los pacientes, lo cual es importante ya que no todos los FAC son sustratos de los transportadores ABC, lo cual también añade un grado mayor de variabilidad y resta validez a sus conclusiones.

Dado el gran número de investigaciones y los resultados dispares, se han realizado varios meta-análisis, el último el año 2015 (88). En este análisis se observa que si se consideran todos los pacientes no se obtiene una relación estadísticamente significativa entre la presencia del SNP *rs1045642* y la respuesta a los FAC; sin embargo, al analizar los pacientes caucásicos si se logró un resultado significativo, con una mayor presencia del alelo T en pacientes resistentes, con un OR 1.2 (88). Destaca del estudio que en el análisis de sensibilidad se observa una alta dispersión y heterogeneidad en los estudios con pacientes asiáticos, lo cual no es tan notorio en los estudios con caucásicos (88).

La presencia de resultados contradictorios llevó a la búsqueda de otros genes candidatos relacionados con la resistencia a fármacos; dentro de estos ha tomado importancia el de la proteína ABCC2. El gen humano *ABCC2* se encuentra en el cromosoma 10; está compuesto de 34 exones y posee un largo total del ADN complementario de 4.868 pares de bases (89). Se han descrito múltiples SNP en las regiones codificantes, así como también en las regiones no transcritas 5' y 3', que se han relacionado con respuesta y toxicidad de fármacos; las más frecuentemente descritas son -24C>T (*rs717620*), 1249G>A (*rs2273697*) y 3972C>T (*rs3740066*), de las cuales la primera se ha relacionado con una disminución de la expresión de *ABCC2*, y se ha asociado con cambios farmacocinéticos de varias drogas, entre ellas anticonvulsivantes(89).

La primera investigación relacionada con resistencia a FACs fue realizada por Seo y colaboradores el año 2008, analizando el SNP -24C>T (*rs717620*), en pacientes con epilepsia de distintas etiologías, el cual no encontró diferencias significativas (90). Cabe destacar que existió una alta proporción de pacientes con epilepsia estructural, con una distribución asimétrica entre los grupos (40 % del total de los pacientes, con un 56% del grupo resistente v/s un 26% del grupo respondedor a fármacos), además de existir una alta proporción de pacientes con retardo mental (85% de pacientes del grupo resistente y 50% del grupo respondedor) (90). El primer estudio que evidenció diferencias fue publicado por Ufer el año 2009 en población caucásica en Alemania; en este se observó una mayor proporción de pacientes resistentes con el genotipo heterocigoto C/T, con un OR 2.24, al comparar resistentes v/s respondedores; además se observó un desequilibrio de ligamiento entre el alelo -24T con el alelo 1249G, el cual se ha descrito relacionado con disminución de la función de transporte duodenal (91). En esta investigación además se plantea una probable relación del SNP -24T con una regulación al alza de *ABCBI*, pues encontraron niveles aumentados de expresión de ARNm de *ABCBI* en pacientes con genotipo *ABCC2* -24TT (91). Desde la fecha se han publicado varias investigaciones que buscan relacionar el SNP con la respuesta a fármacos (Tabla 6).

Tabla 6: Resultados de estudios que han investigado la relación del polimorfismo -24C>T (rs717620) del gen *ABCC2* en la respuesta a FAC

Autor	Año	Población	Resistentes	Respondedores	Resultado
Seo	2008	Japón	133	146	No significativo
Kim	2009	Korea	198	193	No significativo
Ufer	2009	Alemania	118	103	OR 2.15
Ufer	2011	Alemania	176	32	No significativo
Kwan	2011	China	262	328	No significativo
Qu	2012	China	217	320	OR 4.06
Sha'Ri	2014	China -Malasia - India - Japon	987	1069	OR 1.5
Ma CL	2014	China	246	207	OR 1.88
Zhou L	2015	China	156	235	No significativo

Fuente: Elaboración propia en base a los estudios mencionados

De los estudios que han mostrado asociación llama la atención el realizado por Sha'Ri y colaboradores, en población de India, Malasia, China y Japón; en esta investigación se reclutó 2056 pacientes, de los cuales el 48% eran no respondedores; se obtuvo como resultado que el genotipo GC se observó con mayor proporción en pacientes no respondedores (OR 1.5), y además el genotipo GT se observó con mayor proporción en respondedores (OR 0.6) (96); además resulta interesante el hallazgo que, al realizar el análisis en el sub-grupo de pacientes que se describen como epilepsia criptogénica (sin etiología estructural demostrada) la proporción se ve acentuada, en donde el genotipo GC se presenta más en no respondedores (OR 5.6) y el genotipo GT se presenta más en respondedores (OR 0.068) (96). Lo anterior va en concordancia con un potencial rol de los transportadores en la resistencia a fármacos en pacientes con epilepsia no estructural.

Similar a lo ocurrido con *ABCB1*, también se ha realizado un meta-análisis de estudios para *ABCC2*, en donde se observa una relación entre el SNP -24C>T, específicamente el genotipo CT + CC v/s TT OR 1.38, tanto al combinar las distintas poblaciones como también al realizar el análisis por subgrupo con los pacientes caucásicos; sin embargo, no se encuentra la asociación al analizar solo los pacientes asiáticos (99).

En este contexto surge la pregunta clínica acerca si es que, en la población chilena, los **pacientes con epilepsia resistente a fármacos**, presentan un **mayor hallazgo de los polimorfismos de riesgo de los genes *ABCB1* y *ABCC2***. Cabe destacar que, a la fecha, no existen estudios de polimorfismos en los genes descritos en ninguna población

sudamericana con epilepsia refractaria. Por lo tanto, la importancia de la investigación en esta área se hace necesaria, dado el gran porcentaje de pacientes epilépticos que presentan resistencia a fármacos.

CAPÍTULO 4

Hipótesis y Objetivos

4.1. Pregunta Clínica e Hipótesis

La pregunta clínica es: **en la población chilena, ¿pacientes con epilepsia resistente a fármacos, presentan una mayor frecuencia de hallazgo de los polimorfismos del gen *ABCB1* C3435T y/o del gen *ABCC2* c.-24C>T?**

La Hipótesis de esta investigación es que la presencia de los polimorfismos en estudio (*ABCB1* C3435T y *ABCC2* c.-24C>T) se reflejará en una distinta proporción entre pacientes con epilepsia respondedores y resistentes al tratamiento, con mayor proporción de genotipos de riesgo en pacientes resistentes al tratamiento farmacológico comparado a aquellos con buena respuesta al tratamiento.

H0: No se observará una mayor cantidad de los polimorfismos mencionados en los pacientes epilépticos resistentes a fármacos.

H1: Sí se observará una mayor cantidad de los polimorfismos mencionados en pacientes los pacientes epilépticos resistentes a fármacos.

4.2. Objetivos

Objetivo General

- Determinar la relación entre la presencia de polimorfismos genéticos y la eficacia terapéutica de los fármacos anticonvulsivantes.

Objetivos Específicos

1. Determinar, utilizando técnicas de genética molecular, la presencia de variantes de *ABCB1* y *ABCC2* en una cohorte de pacientes con epilepsia refractarios a tratamiento y pacientes respondedores.
2. Comparar las frecuencias genéticas y alélicas para los polimorfismos entre los grupos de estudio.
3. Desarrollar una metodología de trabajo interdisciplinario que integre a clínicos, académicos, alumnos y pacientes, tanto en áreas asistenciales como en técnicas de biología molecular, con el fin de optimizar el tratamiento de una patología común como la epilepsia.

CAPÍTULO 5

Materiales y Métodos

5.1 Tipo de Estudio

Enfoque

El enfoque de este estudio es cuantitativo, debido a que se utiliza la recolección de datos para probar hipótesis, con base en la medición numérica y análisis estadístico.

Alcance

El alcance de esta investigación es de tipo correlacional, cuyo propósito es conocer la relación existente entre dos o más conceptos, categorías o variables en un contexto en particular.

Diseño

El diseño de esta investigación es no experimental transversal correlacional. Por un lado, es no experimental, debido a que en el estudio realizado no se manipulan deliberadamente las variables, sino que se observan los fenómenos en su ambiente natural para después analizarlos. Por otro lado, es transversal, ya que se recolectan los datos en un solo momento, en un tiempo único. Finalmente, es correlacional dado que se describen relaciones entre dos o más categorías, conceptos o variables en un momento determinado.

5.2. Población y Muestra

Población

Pacientes que se encuentran en control en el Policlínico de Neurología del Hospital Carlos van Buren con diagnóstico de epilepsia. Los pacientes son diagnosticados y clasificados acorde a las guías de la Liga Internacional contra la Epilepsia.

Muestra

Pacientes con diagnóstico de epilepsia, que califiquen dentro de la definición de epilepsia resistente a tratamiento farmacológico, que se encuentren en control en el Policlínico de Epilepsia Refractaria. Un sujeto se considerará como resistente al tratamiento farmacológico si falla a dos intentos de anticonvulsivantes apropiadamente escogidos y tolerados, administrados en forma correcta, y no consigue la libertad sostenida de crisis en un período de un año

Tipo de muestreo

El tipo de muestreo de este estudio es no probabilístico, en el cual la elección de los elementos no depende de la probabilidad, sino de causas relacionadas con las características de la investigación o de quien hace la muestra. Se obtendrán pacientes que se encuentren en control y se solicitará su participación voluntaria al estudio.

Tamaño de la muestra

Considerando la población de Valparaíso, se estima un total de aproximadamente 2800 pacientes epilépticos (1% de la población), de los cuales un 60% corresponderán a una epilepsia idiopática (sin causa aparente), 1600 pacientes aproximadamente, de los cuales un tercio (aproximadamente 500 pacientes) serán resistentes al tratamiento farmacológico. Teniendo en cuenta una población teórica total de 500 pacientes resistentes a tratamiento, considerando que según la bibliografía encontraremos alrededor de un 30% de polimorfismos de riesgo, un 10% de error y nivel de confianza de 95% nos da que necesitamos un total de 70 pacientes resistentes a tratamiento. Siguiendo la misma línea, con una población teórica de 1100 pacientes respondedores a tratamiento y considerando

que según la bibliografía existe alrededor de un 15% de pacientes con polimorfismos a estudiar, da que se requieren 50 pacientes respondedores a tratamiento.

Criterios de Selección de la muestra

Se considerarán como criterios de inclusión la presencia de un estudio etiológico básico compuesto por Resonancia Magnética de Encéfalo con protocolo de Epilepsia sin hallazgos patológicos, Electroencefalograma Digital positivo y seguimiento clínico de al menos un año. Se considerarán como criterios de exclusión las siguientes situaciones: presentar reacciones farmacológicas adversas severas, encontrar falta de seguridad en el registro de frecuencia de crisis, hallar mala adherencia al tratamiento farmacológico, presentar trastorno sistémico o neurológico progresivo / degenerativo, presentar falla renal o hepática y la coexistencia de crisis psicogénica y/o trastornos psiquiátricos severos.

A todos los pacientes que voluntariamente acepten participar en esta investigación se les solicitará leer y firmar la ficha de consentimiento informado, aprobado por el Comité de Ética e Investigación Científica del Hospital Carlos van Buren.

5.3 Intervención

A todos los participantes de este estudio, en primera instancia, se les realizará un control inicial en el cual aplicará una entrevista clínica con el objetivo de recolectar variables sociodemográficas y clínicas relacionadas, por un lado, con el tipo y frecuencia de crisis y, por otro lado, con el consumo de anticonvulsivantes e historia médica previa.

Variables a Evaluar:

- Edad de inicio de las crisis
- Nivel Educativo
- Comorbilidades
- Fármacos en uso actual y dosis
- Fármacos usados previamente
- Tipo de Epilepsia (En relación a localización)
- Número de crisis mensuales (promedio 3 meses)
- Tipo de Crisis

Luego, en una segunda instancia, se les tomarán muestras de saliva mediante un kit y extracción del ADN purificado para la genotipificación, a través del ensayo de PCR asociada a Polimorfismos de Restricción de Longitud de Fragmentos, PCR-RFLP (polymerase chain-restriction fragment length polymorphism) de manera enmascarada para la determinación de los polimorfismos *ABCBI* C3435T y *ABCC2* c.-24C>T.

Para la genotipificación se utilizarán los siguientes partidores (primers):

- *ABCBI*: Se amplifica una hebra de ADN genómico que contiene el sitio del polimorfismo C3435T (rs1045642) utilizando los siguientes oligonucleótidos:
 - Sense: 5'-ACTCTTGTTTTTCAGCTGCTTG-3'
 - Antisense: 5'-AGAGACTTACATTAGGCAGTGA-3'

El producto de PCR obtenido se digiere con enzima de restricción *Sau3AI*, según instrucciones del fabricante. (67) (100)

- *ABCC2*: Se amplifica una hebra de ADN genómico que contiene el sitio del polimorfismo -24C>T (rs 717620) utilizando los siguientes oligonucleótidos:

- Sense: 5'-TAAATGGTTGGGATGAAAGG-3'
- Antisense: 5'-GCTTTAGACCAATTGCACATC-3'

El producto de PCR obtenido se digiere con enzima de restricción Bpi I (95)

Las condiciones de la PCR-RFLP son las siguientes: 5 minutos de desnaturalización inicial a 95°, luego 35 ciclos a 94° por 30 segundos, 56° por 20 segundos, 72° por 30 segundos y un período final de 72° por 5 minutos; se lleva a cabo con 50 ng de ADN, 2.5 mM de Cloruro de Magnesio, 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 uM de cada primer y 1 U de Taq polimerasa (17). Luego se toma una alícuota de 10 ul con la enzima de restricción correspondiente a 37° por 4 horas. Posteriormente se mezcla con el colorante y se corre a través de la electroforesis en gel de agarosa y visualizado con transiluminación ultravioleta.

5.4. Manejo Estadístico

Se realizará una descripción de las variables cualitativas por medio de frecuencias absolutas y relativas, y las cuantitativas por medio de promedio con desviación estándar o mediana asociado a rango intercuartil según corresponda (variando según normalidad de los datos).

Para el análisis estadístico inferencial y determinación de significación de las relaciones se utilizará la prueba exacta de Fisher para la comparación de variables Cualitativas. Para la comparación cuantitativa/ cualitativa se ocupará la prueba de t de Student, Mann-Whitney o Wilcoxon según corresponda por normalidad de las variables encontradas.

Para determinar la significancia estadística entre el hallazgos de los polimorfismos y la presencia de resistencia se utilizará el estadígrafo Odds Ratio (o razón de verosimilitud) por ser datos no prospectivos obtenidos de manera transversal.

CAPÍTULO 6

Resultados

6.1. Resultados Generales

El reclutamiento se encuentra en proceso. Se ha entrevistado y analizado un total de 50 pacientes, del cual 23 son resistentes a fármacos y 27 son respondedores. Las características generales se resumen en la Tabla 7.

En el grupo de pacientes respondedores se encuentran edades entre 16 y 71 años, con una mediana de 27 años; en el grupo de pacientes resistentes se encuentran edades entre 21 y 71 con una mediana de 45 años. El uso de fármacos de los pacientes se describe en la Tabla 2; en el grupo de pacientes respondedores existe una mediana de un fármaco (hay un 85% de los pacientes en monoterapia, sólo cuatro pacientes en bi-terapia), siendo el Ácido Valproico el más utilizado; mientras que en el grupo de pacientes resistentes existe una mediana de dos fármacos (hay un 87% de politerapia, con tres paciente en monoterapia), siendo la combinación más frecuente el uso de Carbamazepina o Ácido Valproico con otro fármaco.

Del estudio, en los pacientes respondedores se encontró un 77% de los pacientes (21/27) con hallazgos presentes en el EEG, de los cuales principalmente se distribuyeron en actividad epileptiforme a nivel Frontal (en 12/27, 44% del total), seguido de actividad a nivel Temporal (7/27, 26% del total) y dos pacientes con actividad generalizada. En los pacientes resistentes se encontró un 92% de los pacientes (21/23) con actividad epileptiforme, de los cuales se distribuyó entre actividad Frontal (en 11/23, 48% del total), Temporal (en 9/23, 39% del total) y un paciente con actividad generalizada.

Tabla 7: Características Generales

	Pacientes respondedores (n=27)	Pacientes Resistentes (n=23)
Edad, mediana (rango)	27 (16 – 71)	45 (23 – 71)
Edad de inicio, mediana (rango)	15 (3 – 61) <ul style="list-style-type: none"> • < 15 años: 14/27 • > 15 años: 13/27 	9 (1 – 50) <ul style="list-style-type: none"> • <15 años: 18/23 • >15 años: 5/23
Tipo epilepsia (localización según hallazgos al EEG)	Normal: 6/27 (22%) Frontal: 12/27 (44%) Temporal: 7/27 (26%) Generalizada: 2/27 (8%)	Normal: 2/23 (9%) Frontal: 11/23 (48%) Temporal: 9/23 (39%) Generalizada: 1/23 (4%)
Crisis mensuales, mediana (rango)	0 (0-1) <ul style="list-style-type: none"> • 0/mes: 26/27 • 1/mes: 1/27 • >1/mes: 0/27 	3 (1 – 10) <ul style="list-style-type: none"> • 0/mes: 0 • 1/mes: 6/23 • 2-5/mes: 14/23 • >5/mes: 3/23
Tipo de crisis	Parciales Simples: 4/27 (15%) Parciales Complejas: 12/27 (44%) Gen. Primarias: 13/27 (48%) Gen. Secundarias: 5/27 (19%)	Parciales Simples: 2/23 (9%) Parciales Complejas: 15/23 (65%) Gen. Primarias: 6/23 (26%) Gen. Secundarias: 6/23 (26%)

Respecto al control de la enfermedad y el tipo de crisis que presentan los pacientes, el grupo de pacientes respondedores presentaron una mediana de ninguna crisis mensual (sólo un paciente con 2 crisis en los últimos 3 meses de tipo parcial compleja) y todos los pacientes consideraban que su enfermedad se encontraba suficientemente controlada. Sobre tipo de crisis presentadas al momento del diagnóstico de Epilepsia en un 67% (18/27) fueron de tipo generalizada (tanto primaria como secundariamente generalizadas en igual proporción), 15% (4/27) parciales simples y 44% (12/27) parciales complejas.

En el grupo de pacientes resistentes presentaron una mediana de 3 crisis mensuales (con un rango entre 1 y 10), considerando 5/23 pacientes (22%) un parcial control de la

enfermedad. Sobre tipo de crisis presentadas al momento del diagnóstico de Epilepsia un 52% (12/23) presentaron de tipo generalizadas (tanto primaria como secundariamente generalizadas), 9% (2/23) parciales simples y 65% (15/23) parciales complejas.

Tabla 8: Fármacos en Uso

	Pacientes Respondedores	Pacientes Resistentes
Número de Fármacos en Uso, Mediana (rango)	1 (1 - 2) <ul style="list-style-type: none"> • 1 fármaco: 23/27 (85%) • 2 fármacos: 4/27 (15%) • ≥ 3 fármacos: 0/27 (0%) 	2 (2 - 5) <ul style="list-style-type: none"> • 1 fármaco: 0/23 (0%) • 2 fármacos: 14/23 (61%) • ≥ 3 fármacos: 9/23 (39%)
Fármacos Clásicos en Uso, Proporción, Dosis media (mg) y rango (mg)	Fenitoína: 7/27, 229 (100 – 400) Carbamazepina: 4/27, 500 (200-600) Ácido Valproico: 14/27, 836 (400-1400) Fenobarbital: 1/27, 150 (150)	Fenitoína: 4/23, 325 (200 – 500) Carbamazepina: 14/23, 985 (700-1500) Ácido Valproico: 10/23, 630 (200-1600) Fenobarbital: 4/23, 125 (100-150)
Fármacos Noveles en Uso, Proporción, Dosis media (mg) y rango (mg)	Lamotrigina: 4/27, 113 (100-150) Levetiracetam: 4/27, 1250 (1000-1500)	Lamotrigina: 7/23, 196 (75-300) Levetiracetam: 7/23, 1700 (1000-3000)
Fármacos Clásicos Utilizados Previamente, Proporción (descartados por falta de efectividad)	Fenitoína: 0/27 Carbamazepina: 2/27 Ácido Valproico: 0/27 Fenobarbital: 0/27	Fenitoína: 12/23 Carbamazepina: 10/23 Ácido Valproico: 6/23 Fenobarbital: 8/23

6.2. Genotipificación

Del total de muestras obtenidas se logró genotipificar 32 para el gen *ABCB1* y 37 para el gen *ABCC2*. La distribución general de las muestras se describe en la Tabla 9.

Tabla 9: Resultados Generales de Genotipificación <i>ABCB1 C3435T (rs 1045642)</i> y <i>ABCC2 c.-24C>T (rs717620)</i>				
<i>ABCB1 C3435T (rs 1045642)</i>				
		CC	CT	TT
Total Pacientes		14 (44)	15 (47)	3 (9)
N (%)				
<i>ABCC2 c.-24C>T (rs717620)</i>				
		CC	CT	TT
Total Pacientes		12 (32%)	24 (65)	1 (3)
N (%)				

Al separar los resultados según el grupo estudiado se observó lo descrito en la Tabla 10.

En relación al polimorfismo *C3435T* en el gen *ABCB1*, en pacientes respondedores se encontró la siguiente distribución: CC = 7 (32%), CT =12 (55%) y TT = 3 (13%), con mayor presencia del alelo CT; mientras que en pacientes no respondedores se encontró la siguiente distribución CC = 7 (35%), CT =13 (65%) y no se encontró presencia del alelo TT. Al comparar las proporciones en los pacientes con resistencia fue más frecuente encontrar el alelo CT sin alcanzar diferencia estadísticamente significativa (65% v/s 55% OR 1,51 IC 0,85 – 2,68 p=0,14).

Al evaluar el polimorfismo *c.-24C>T* en el gen *ABCC2*, en pacientes respondedores se encontró la siguiente distribución: CC = 6 (35%), CT =10 (59%) y TT = 1 (6%), con mayor presencia del alelo CT; mientras que en pacientes no respondedores se encontró la siguiente distribución CC = 6 (30%), CT =14 (70%) y no se encontró presencia del alelo

TT. Al comparar las proporciones en los pacientes con resistencia fue más frecuente encontrar el alelo CT sin alcanzar diferencia estadísticamente significativa (70% v/s 59% OR 1,62 IC 0,9 – 2,9 p=0,10).

Tabla 10: Resultados de Genotipificación <i>ABCB1 C3435T</i> (<i>rs 1045642</i>) y <i>ABCC2 c.-24C>T</i> (<i>rs717620</i>) separados según resistencia a fármacos				
<i>ABCB1 C3435T</i> (<i>rs 1045642</i>)				
		CC	CT	TT
Pacientes Respondedores N (%)	27	7 (32)	12 (55)	3 (13)
Pacientes No Respondedores N (%)	23	7 (35)	13 (65)	0
Controles Sanos N (%)	21	3 (15)	18 (85%)	0
<i>ABCC2 c.-24C>T</i> (<i>rs717620</i>)				
		CC	CT	TT
Pacientes Respondedores N (%)	27	6 (35)	10 (59)	1 (6)
Pacientes No Respondedores N (%)	23	6 (30)	14 (70)	0
Controles Sanos N (%)	21	0	20 (95)	1 (5)

CAPÍTULO 7

Discusión

El objetivo de este estudio es buscar formas de ayudar a los clínicos en el manejo de una patología difícil como lo es la epilepsia resistente a fármacos, en donde mientras antes se pueda identificar, más opciones de éxito tendrán tanto las medidas farmacológicas como las no farmacológicas en el logro del control de las crisis.

Las técnicas de análisis genético han tenido en el último tiempo un desarrollo enorme gracias a el análisis computacional y la automatización del trabajo; sin embargo tales estudios tienen un costo prohibitivo a nivel de países en desarrollo, más aún en instituciones públicas en Chile; es por eso que decidimos utilizar una técnica establecida, simple, de bajo costo pero con ciertas limitaciones técnicas (sólo se puede evaluar la presencia de un polimorfismo por estudio, lo cual la hace de bajo rendimiento a nivel poblacional ya que requeriría de un tiempo considerable para su análisis e interpretación); pero supone una ventaja estratégica para el presente estudio, ya que no requiere de equipamiento de última generación para su implementación ni materiales de alto costo, lo que la hace perfectamente utilizable en el ambiente de tamizaje en un grupo de pacientes a nivel público.

El rol de polimorfismos en los genes descritos en la fisiopatología de la resistencia a fármacos tiene plausibilidad biológica, ya que codifican para la síntesis de proteínas del complejo ABC que se ha establecido relación con resistencia a drogas en otras enfermedades (múltiples formas de cáncer, artritis reumatoide y enfermedad inflamatoria intestinal) (39). Su rol de protección frente a sustancias xenobióticas plantea un potencial mecanismo de resistencia y uno de los principales argumentos a favor de esta posición es el hecho que la resistencia ocurre en una gran variedad de fármacos con distintos mecanismos de acción en un mismo paciente, lo cual sugiere que se produce un fenómeno no específico que limita la efectividad de los tratamientos (34).

La presencia de una asociación entre los polimorfismos mencionados y la resistencia a fármacos en epilepsia sigue siendo un debate. Existen múltiples estudios con

resultados positivos, así como también algunos meta-análisis, sin embargo, existen también estudios con resultados negativos, e inclusive algunos con resultados positivos pero contrapuestos. Frente a esto se debe tener en cuenta la variabilidad genética poblacional, por lo que es necesario contar con investigaciones a nivel de población local para poder comparar los resultados y obtener conclusiones válidas y aplicables.

En el presente trabajo no se encontró una asociación significativa entre los polimorfismos genéticos en los genes *ABCB1* y *ABCC2* y la respuesta a fármacos anticonvulsivantes. Sin embargo, se debe mencionar que no se ha obtenido alelos TT en pacientes epilépticos no respondedores, lo cual puede estar en relación con el bajo número de pacientes reclutados. Esto ha impedido realizar un análisis de distribución de los polimorfismos (Equilibrio de Hardy – Weinberg) y evidencia una muestra no representativa de la población. Los resultados sólo se podrán analizar con una mayor representatividad y poder estadístico al tener una muestra mayor.

Al comparar los resultados de todos los pacientes con las bases de datos internacionales (tablas 11 y 12) se puede evidenciar una diferencia clara entre las distribuciones generales de los alelos, lo que sugiere una muestra probablemente no representativa de la población, o de forma menos probable, una variación a nivel genómico poblacional (queda pendiente el análisis de los resultados con un mayor número de pacientes).

Tabla 11: Comparación de resultados generales con bases de datos internacionales				
<i>ABCB1 C3435T (rs 1045642)</i>				
	Total	CC	CT	TT
Pacientes Chilenos N (%)	32	14 (44)	15 (47)	3 (9)
Controles Sanos Chilenos N (%)	21	3 (14)	18 (86)	0
Población Peruana N (%)	86	30 (36)	44 (51)	11 (13)
Población Colombiana N (%)	94	30 (32)	45 (48)	19 (20)
Población Inglesa N (%)	92	20 (22)	46 (50)	26 (28)
Población China Han N (%)	103	43 (42)	42 (41)	18 (17)

Tabla 11: Comparación de resultados generales con bases de datos internacionales (continuación)				
<i>ABCC2 c.-24C>T (rs717620)</i>				
		CC	CT	TT
Total Pacientes N (%)		12 (32)	24 (65)	1 (3)
Controles Sanos Chilenos N (%)	21	0	20 (95)	1 (5)
Población Peruana N (%)	86	73 (85)	12 (14)	1 (1)
Población Colombiana N (%)	94	62 (66)	30 (32)	2 (2)
Población Inglesa N (%)	92	56 (61)	31 (34)	5 (5)
Población China Han N (%)	103	61 (59)	37 (36)	5 (5)

Al revisar la literatura es de importancia evaluar el grupo de pacientes estudiados, mientras que en la mayoría de los estudios se ha incluido pacientes epilépticos sin diferenciar la causa de la epilepsia, nosotros hemos preferido no incluir pacientes con causa estructural definida, ya que en estos pacientes pueden estar en juego distintos mecanismos de resistencia, tales como cambios específicos en la zona epileptógena (como en pacientes con esclerosis mesial temporal) o consecuencias de injurias locales (como en pacientes con epilepsia estructural secundaria a TEC o post-quirúrgicas). A nuestro parecer esto es de fundamental importancia pues define a un grupo de pacientes sin aparente riesgo de

resistencia (sin causa categórica) pero que de todas formas tiene una mala respuesta a los fármacos, y en los cuales no existe forma de diferenciarlos.

En ese sentido nos parece importante destacar la importancia de investigaciones como la actual a nivel de distintas poblaciones, y en el caso nuestro, en población chilena; la investigación presente surge como cooperación de equipos de investigación básica y equipos clínicos, la cual es posible sólo gracias a iniciativas locales y voluntades personales, dada la baja cooperación a nivel gubernamental.

Adicionalmente se debe mencionar que el trabajo actual se encuentra en desarrollo, y como parte de los resultados se debe mencionar la adjudicación de financiamiento gubernamental a través FONIS (Fondo Nacional de Investigación y Desarrollo en Salud de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica CONICYT), de manera que se asegura la continuidad del trabajo y la futura difusión de sus resultados.

El objetivo final del trabajo a futuro es la evaluación de forma prospectiva de la utilidad de la genotipificación en pacientes epilépticos, de manera de encontrar estrategias de determinación del riesgo de resistencia, para así orientar, por ejemplo, el uso de anticonvulsivantes (utilizar por ejemplo aquellos que no sean sustrato de complejo ABC), encontrar potenciales blancos terapéuticos (inhibición del complejo ABC) o realizar un seguimiento más cercano en paciente de riesgo, disminuyendo el número de fármacos a evaluar y utilizando estrategias no farmacológicas de forma precoz.

CAPÍTULO 8

Conclusiones

Gracias al desarrollo de esta tesis, concluimos que la técnica de Genotipificación a través de PCR-RFLP es factible de realizar en instituciones públicas con un bajo costo y rendimiento adecuado, pudiendo su utilidad no solamente estar limitada al estudio de pacientes con Epilepsia, sino a otras patologías Neurológicas.

A partir de las muestras de 50 pacientes reclutados al término de esta tesis, 50 pacientes, de los cuales 23 son resistentes a fármacos y 27 son respondedores, no se encontró una asociación significativa entre los polimorfismos genéticos en los genes *ABCB1* y *ABCC2* estudiados y la respuesta a fármacos anticonvulsivantes.

Tal como ha sido discutido, los resultados sólo pueden analizarse con una mayor representatividad y poder estadístico al tener una muestra mayor, para así lograr un resultado comparable a investigaciones internacionales.

Importantemente, evidenciamos que existen las capacidades para desarrollar colaboraciones interdisciplinarias efectivas entre Académicos Universitarios y Médicos Especialistas de la red de atención de un Hospital Público Chileno. A nuestro parecer es fundamental el apoyo gubernamental de instancias de colaboración básico-clínicas, ya que son la principal fuente potencial de desarrollo de investigaciones aplicadas al enfrentamiento con pacientes en nuestra realidad nacional. Respecto a este punto, es menester mencionar que el trabajo de investigación de la presente tesis fue el cimiento para la generación y postulación de un proyecto enviado a concurso al Fondo Nacional de Investigación y Desarrollo en Salud (FONIS) que resultó adjudicado el 2016 (Proyecto FONIS SA16I003). Dicho financiamiento proveerá los fondos para ampliar el tamaño del estudio aquí propuesto, de manera de determinar la utilidad del uso de la genotipificación en pacientes chilenos con Epilepsia como posibles biomarcadores de resistencia a fármacos.

REFERENCIAS

- (1) Ministerio de Salud. Guía Clínica Epilepsia en Adultos. Santiago: MINSAL, 2013-2014
- (2) Schuele SU, Luders HO. Intractable epilepsy: management and therapeutic alternatives. *Lancet Neurol*, 2008, Jun 7;514-524.
- (3) Pati S, Alexopoulos AV. Pharmacoresistant epilepsy: From pathogenesis to current and emerging therapies. *Cleve Clin J Med*, 2010, Jul 77; 457-467.
- (4) Fisher, RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J Jr. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 2005, Apr 46: 470–472.
- (5) French JA, Dichter MA. New antiepileptic drug development: Medical perspective. In: Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS, Perucca E (editors) *Antiepileptic Drugs*, LWW; Fifth edition; 2002.
- (6) Berg, AT., Berkovic, SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W., et al (2010), Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia*, Apr 51: 676–685.
- (7) COMMISSION ON CLASIFICACION AND TERMINOLOGY FOR THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY: Proposal for Revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*, 1981; 22 489–501.
- (8) COMMISSION ON CLASIFICACION AND TERMINOLOGY FOR THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY: Proposal for Revised Classification of Epilepsies and Epileptic Syndromes. *Epilepsia*, 1989 30: 389–399.
- (9) Sander JW, Hart YM, Johnson AL et al. National General Practice Study of Epilepsy: newly diagnosed epileptic seizures in a general population. *Lancet*. 1990; 336(8726):1267-1271.
- (10) Berg AT, Shinnar S. The risk of seizure recurrence following a first unprovoked seizure: a quantitative review. *Neurology*. 1991;41(7):965–972

- (11) Lhatoo SD, Johnson AL, Goodridge DM et al. Mortality in epilepsy in the first 11 to 14 years after diagnosis: multivariate analysis of a long-term, prospective, population- based cohort. *Ann Neurol*. 2001; 49(3):336-344.
- (12) Chong DJ, Bazil CW; Update on Anticonvulsant Drugs. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2010, Jul 10. 308 - 318
- (13) Noe KH; Seizures: Diagnosis and Management in the Outpatient Setting. *Seminars in Neurology*, 2011; 31: 54-64
- (14) Krumholz A, Shinnar S, French J, Gronseth G, Wiebe S. Evidence-based guideline: Management of an unprovoked first seizure in adults. Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. *Neurology*. 2015 Oct 27; 85: 1526-1527
- (15) Schmidt, D, Sillanpaa M. Evidence based review of natural history of Epilepsies. *Curr Opin Neurol*. 2012, Apr 25. 159-163
- (16) Chang BS, Lowenstein DH. Mechanisms of Disease: Epilepsy. *N Engl J Med* 2003; Sept 25; 349: 1257-1266
- (17) Scharfman, HE. The Neurobiology of Epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2007 Jul 7: 348-354
- (18) Bromfield EB, Cavazos JE, Sirven JI, editors. *An Introduction to Epilepsy* [Internet]. West Hartford (CT): American Epilepsy Society; 2006. Chapter 1, Basic Mechanisms Underlying Seizures and Epilepsy. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2510/>
- (19) Beck H, Yaari Y. Antiepileptogenesis, Plasticity of AED Targets, Drug resistance, and Targeting the Immature Brain. In: *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98216/>
- (20) Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, 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: 1069–1077.

- (21) Espinosa-Jovel CA, Sobrino-Mejía FE. Farmacorresistencia en epilepsia. Conceptos clínicos y neurobiológicos. *Rev Neurol* 2015;61 (04):159-166
- (22) Nei M, Bagla R. Seizure related injury and death. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2007, Jul 7. 335-341.
- (23) Hitiris N, Mohanraj R, Norrie J, Sills GJ, Brodie MJ. Predictors of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsy Res* 2007; 75: 192-6.
- (24) Wang SP, Mintzer S, Skidmore CT, Zhan T, Stuckert E, Nei M et al. Seizure recurrence and remission after switching antiepileptic drugs., *Epilepsia*, 2013, Jan 54. 187-193
- (25) Brodie MJ, Barry SJ, Bamagous GA, Kwan P. Effect of dosage failure of first antiepileptic drug on subsequent outcome. *Epilepsia*, 2013, Jan 54, 194-198.
- (26) Loscher W, Klotz U, Zimprich F, Schmidt D. The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. *Epilepsia*, 2009, Jan 50, 1-23.
- (27) Gorter JA, Potschka H. Drug Resistance. In: Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98215/>
- (28) van Vliet EA, et al. Decreased expression of synaptic vesicle protein 2A, the binding site for levetiracetam, during epileptogenesis and chronic epilepsy. *Epilepsia*. 2009. 50:422–433
- (29) Kwan P, Brodie MJ. Effectiveness of first antiepileptic drug. *Epilepsia*. 2001, 42: 1255–1260.
- (30) Heidrun Potschka, Martin J. Brodie, Chapter 43 - Pharmacoresistance, In: Hermann Stefan and William H. Theodore, Editor(s), *Handbook of Clinical Neurology*, Elsevier, 2012, Volume 108, Pages 741-757
- (31) Brodie MJ, Barry SJE, Bamagous GA et al. Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy. *Neurology*. 2012, 78: 1548–1554
- (32) Remy S, Beck H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain*. 2006, Jan 129 (1) 18-35.
- (33) Kwan P, Schachter SC, Brodie MJ. Drug Resistant Epilepsy. *N Engl J Med*, 2011, Sep 8; 365: 919-926

- (34) Kwan P, Brodie MJ. Potential Role of Drug Transporters in the Pathogenesis of Medically Intractable Epilepsy. *Epilepsia*, 2005, Feb 46. 224-235
- (35) Losher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nature Reviews Neurosc.* 2005; Aug 6, 591-602
- (36) John J. Laterra, Gary W. Goldstein, Appendix D - The Blood–Brain Barrier, Choroid Plexus, and Cerebrospinal Fluid, In: Eric Kandel and James Schwartz, Editor (s), *Principles of Neural Science*, Fifth Edition, McGraw Hill, 2013, Pages 1565 - 1578
- (37) ElAli A, Hermann DM. ATP-Binding Cassette Transporters and Their Roles in Protecting the Brain; *Neuroscientist*, 2011; Aug 17: 423-436
- (38) Stepien KM, Tomaszewski M, Tomaszewska J, Czuczwa SJ. The Multidrug Transporter P-glicoprotein in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *Pharmacol Rep*, 2012, 64. 1011-1019
- (39) Aronica E, Sisodiya SM, Gorter JA. Cerebral expression of drug transporters in epilepsy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, Jul 64. 919-929
- (40) Sun H, Dai H, Shaik N, Elmquist WF. Drug efflux transporters in the CNS. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, Jan 21; 55. 83-105
- (41) Wilkens S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Reports*. 2015; 7: 14
- (42) Lazarowski A, Czornyj L, Lubienieki F, Girardi E, Vasquez S, D’Giano C. ABC Transporters during Epilepsy and Mechanisms Underlying Multidrug Resistance in Refractory Epilepsy. *Epilepsia*, 2007, 48 Suppl 5: 140-149
- (43) Tishler DM, Weinberg KI, Hinton DR, Barbaro N, Annet GM, Raffel C. MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia*. 1995; Jan 36:1–6
- (44) Volk HA, Losher W. Multidrug resistance in epilepsy: rats with drug-resistant seizures exhibit enhanced brain expression of P-glycoprotein compared with rats with drug-responsive seizures. *Brain*. 2005, Jun 128, 1358-1368.
- (45) Brandt C, Bethmann K, Gastens AM, Losher W. The multidrug transporter hypothesis of drug resistance in epilepsy: Proof-of-principle in a rat model of temporal lobe epilepsy, *Neurobiol Dis*, 2006, Oct 24; 202-211

- (46) Nies AT, Keppler D, The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 2007, 453:643–659
- (47) Jedlitschky G, Hoffmann U, Kroemer HK, Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006 Jun;2(3):351-66.
- (48) Vogelgesang S, Kunert-Keil C, Cascorbi I, Expression of multidrug transporters in dysembryoplastic neuroepithelial tumors causing intractable epilepsy. *Clin Neuropathol.* 2004 Sep-Oct;23(5):223-31.
- (49) Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Jul;306(1):124-31.
- (50) Shastry BS, Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *The Pharmacogenomics Journal* (2006) 6, 16–21
- (51) Piana C, Antunes Nde J, Della Pasqua O, Implications of pharmacogenetics for the therapeutic use of antiepileptic drugs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* (2014) 10(3):341-358
- (52) Nebert DW. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: why is this relevant to the clinical geneticist? *Clin Genet* 1999; **56**: 345–347.
- (53) Leeder JS. Pharmacogenetics and Pharmacogenomics, *Pediatr Clin North Am*, 2001 Jun 48; 765-782
- (54) Roses AD. Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature* 2000; 405:857–865.
- (55) Rudy Guerra and Zhaoxia Yu - Single Nucleotide Polymorphisms and Their Applications, In: Wei Zhang and Ilya Shmuvelich, Editor (s), *Computational and Statistical Approaches to Genomics*, Second Edition, Springer US, 2006, Pages 311 – 349
- (56) Ferraro TN, Dlugos DJ, Buono RJ. Challenges and opportunities in the application of pharmacogenetics to antiepileptic drug therapy. *Pharmacogenomics* 2006 Jan 7:1, 89-103

- (57) Das A, Balan S, Banerjee M, Radhakrishnan K. Drug resistance in epilepsy and the ABCB1 gene: The clinical perspective. *Indian Journal of Human Genetics*. 2011;17(Suppl 1):S12-S21.
- (58) Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97:3473-3478.
- (59) Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, et al. A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*. 2007, 315:525–8.
- (60) Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, Brinmann U, Smith A, Sisodiya SM. Association of Multidrug Resistance in Epilepsy with a Polymorphism in the Drug-Transporter Gene ABCB1. *N Engl J Med*. 2003, Apr 10; 348:1442-1448.
- (61) Soranzo N, Identifying candidate causal variants responsible for altered activity of the ABCB1 multidrug resistance gene. *Genome Res*. 2004, 14:1333–1344.
- (62) Zimprich F, Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistance in temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 2004 Sep 28;63(6):1087-9.
- (63) Tan NC, Heron SE, Scheffer IE, et al. Failure to confirm association of a polymorphism in ABCB1 with multidrug-resistant epilepsy. *Neurology*. 2004, 63:1090–92.
- (64) Seo T, Ishitsui T, ABCB1 polymorphisms influence the response to antiepileptic drugs in Japanese epilepsy patients. *Pharmacogenomics*. 2006 Jun;7(4):551-61.
- (65) Chen L, Liu CQ, Hu Y, et al. Research on the correlation between childhood epilepsy drug reactions of multidrug resistance gene MDR1 C3435T polymorphism. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2007, 9:11–14.

- (66) Hung CC, Jen Tai J, Kao PJ, et al. Association of polymorphisms in NRI12 and ABCB1 genes with epilepsy treatment responses. *Pharmacogenomics*. 2007;8:1151–58.
- (67) Kwan P, Baur L, Wong V, et al. Association between ABCB1 C3435T polymorphism and drug-resistant epilepsy in Han Chinese. *Epilepsy Behav*. 2007;11:112–17.
- (68) Shahwan A, Murphy K, Doherty C, et al. The controversial association of ABCB1 polymorphisms in refractory epilepsy: an analysis of multiple SNPs in an Irish population. *Epilepsy Res*. 2007;73:192–98.
- (69) Dericioglu N, Babaoglu MO, Yasar U, et al. Multidrug resistance in patients undergoing resective epilepsy surgery is not associated with C3435T polymorphism in the ABCB1 (MDR1) gene. *Epilepsy Res*. 2008;80:42–46.
- (70) Ozgon GO, Bebek N, Gul G, Cine N. Association of MDR1 (C3435T) polymorphism and resistance to carbamazepine in epileptic patients from Turkey. *Eur Neurol*. 2008;59:67–70.
- (71) Szoek C, Sills GJ, Kwan P, et al. Multidrug-resistant genotype (ABCB1) and seizure recurrence in newly treated epilepsy: data from international pharmacogenetic cohorts. *Epilepsia*. 2009;50:1689–96.
- (72) Ufer M, Mosyagin I, Muhle H, et al. Non-response to antiepileptic pharmacotherapy is associated with the ABCC2-24C>T polymorphism in young and adult patients with epilepsy. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19:353–62.
- (73) Lakhan R, Misra UK, Kalita J, et al. No association of ABCB1 Polymorphisms with drug-refractory epilepsy in a north Indian population. *Epilepsy Behav*. 2009;14:78–82.
- (74) Vahab SA, Sen S, Ravindran N, et al. Analysis of genotype and haplotype effects of ABCB1 (MDR1) polymorphisms in the risk of medically refractory epilepsy in an Indian population. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2009;24:255–60.
- (75) Kim DW, Lee SK, Chu K, et al. Lack of association between BCBI, ABCG2, and ABCC2 genetic polymorphisms and multidrug resistance in partial epilepsy. *Epilepsy Res*. 2009;84:86–90.

- (76) Alpman A, Ozkinay F, Tekgul H, et al. Multidrug resistance 1 (MDR1) gene polymorphisms in childhood drug-resistant epilepsy. *J Child Neurol.* 2010;25(12):1485–90.
- (77) Grover S, Bala K, Sharma S, et al. Absence of a general association between ABCB1 Genetic variants and response to antiepileptic drugs in epilepsy patients. *Biochimie.* 2010;92:1207–12.
- (78) Sanchez MB, Herranz JL, Leno C, et al. Genetic factors associated with drug-resistance of epilepsy: Relevance of stratification by patient age and aetiology of epilepsy. *Seizure.* 2010;19:93–101.
- (79) Haerian BS, Lim KS, Mohamed EH, et al. Lack of association of ABCB1 and PXR polymorphisms with response to treatment in epilepsy. *Seizure.* 2011;20:387–94.
- (80) Di Q, Wang LL, Xu LG, et al. Refractory epilepsy and multidrug resistance gene 1 C3435T polymorphism correlation. *Zhonghua Shen Jing Yi Xue Za Zhi.* 2011;10:127–31.
- (81) Dong L, Luo K, Tong Y, et al. Lack of association between ABCB1 gene polymorphisms and pharmaco-resistant epilepsy: an analysis in a western Chinese pediatric population. *Brain Res.* 2011;1391:114–24.
- (82) Kumari R, Lakhan R, Garg RK, et al. Pharmacogenomic association study on the role of drug metabolizing, drug transporters and drug target gene polymorphisms in drug-resistant epilepsy in a north Indian population. *Indian J Hum Genet.* 2011;17:S32–40.
- (83) Sayyah M, Kamgarpour F, Maleki M, et al. Association analysis of intractable epilepsy with C3435T and G2677T/A ABCB1 gene polymorphisms in Iranian patients. *Epileptic Disord.* 2011;13:155–65.
- (84) Emich-Widera E, Likus W, Kazek B, et al. CYP3A5*3 and C3435T MDR1 polymorphisms in prognostication of drug-resistant epilepsy in children and adolescents. *Biomed Res Int.* 2013;2013:526837.
- (85) Emich-Widera E, Likus W, Kazek B, et al. Polymorphism of ABCB1/MDR1 C3435T in children and adolescents with partial epilepsy is due to different criteria for drug resistance – preliminary results. *Med Sci Monit.* 2014;20:1654–61.

- (86) Saygi S, Alehan F, Atac FB, et al. Multidrug resistance 1 (MDR1) 3435C/T genotyping in childhood drug-resistant epilepsy. *Brain Dev.* 2014;36(2):137–42.
- (87) Seven M, Batar B, Unal S, et al. The drug-transporter gene MDR1 C3435T and G2677T/A polymorphisms and the risk of multidrug-resistant epilepsy in Turkish children. *Mol Biol Rep.* 2014;41(1):331–36.
- (88) Shu-xia Li, Yun-yong Liu, Quan-bao Wang, ABCB1 Gene C3435T Polymorphism and Drug Resistance in Epilepsy: Evidence Based on 8604 Subjects. *Med Sci Monit.* 2015; 21: 861–868.
- (89) Van der Schoor LW, Verkade HJ, Kuipers F, Jonker JW. New insights in the biology of ABC transporters ABCC2 and ABCC3: impact on drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2015 Feb;11(2):273-93
- (90) Seo T., Ishitsu T., Oniki K, et al. (2008) ABCC2 haplotype is not associated with drug-resistant epilepsy. *J Pharm Pharmacol* 60:631–635
- (91) Ufer M., Mosyagin I., Muhle H, et al. (2009) Non-response to antiepileptic pharmacotherapy is associated with the ABCC2-24C>T polymorphism in young and adult patients with epilepsy. *Pharmacogenet Genomics* 19:353–362
- (92) Kim DW., Lee SK., Chu K, et al. (2009) Lack of association between ABCB1, ABCG2, and ABCC2 genetic polymorphisms and multidrug resistance in partial epilepsy. *Epilepsy Res* 84:86–90.
- (93) Ufer M., von Stulpnagel C., Muhle H, et al. (2011) Impact of ABCC2 genotype on antiepileptic drug response in Caucasian patients with childhood epilepsy. *Pharmacogenet Genomics* 21:624–630.
- (94) Kwan P., Wong V., Ng PW, et al. (2011) Gene-wide tagging study of the association between ABCC2, ABCC5 and ABCG2 genetic polymorphisms and multidrug resistance in epilepsy. *Pharmacogenomics* 12:319–325.
- (95) Qu J., Zhou BT., Yin JY, et al. (2012) ABCC2 polymorphisms and haplotype are associated with drug resistance in Chinese epileptic patients. *CNS Neurosci Ther* 18:647–651.
- (96) Sha'ari Hidayati Mohd, ABCC2 rs2273697 and rs3740066 polymorphisms and resistance to antiepileptic drugs in Asia Pacific epilepsy cohorts. *Pharmacogenomics* 2014 15:4, 459-466.

- (97) Ma Chun-Lai , Association of SCN1A, SCN2A and ABCC2 gene polymorphisms with the response to antiepileptic drugs in Chinese Han patients with epilepsy. *Pharmacogenomics* 2014 15:10, 1323-1336.
- (98) Zhou L, ABCB1, ABCC2, SCN1A, SCN2A, GABRA1 gene polymorphisms and drug resistant epilepsy in the Chinese Han population. *Pharmazie*. 2015 Jun;70(6):416-20.
- (99) Grover S, Kukreti R, A systematic review and meta-analysis of the role of ABCC2 variants on drug response in patients with epilepsy. *Epilepsia*. 2013 May;54(5):936-45.
- (100) SI Hamdy, Genotype and allele frequencies of TPMT, NAT2, GST, SULT1A1 and MDR-1 in the Egyptian population. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2012, Vol. 18. 647-651
- (101) Scheuer T. Regulation of sodium channel activity by phosphorylation. *Sem Cell Dev Bio*, 2011 Apr;22(2): 160-5

ANEXO 1: TABLAS

Tabla 1: Clasificación de las crisis epilépticas. <i>Modificado de: (7).</i>	
Modo de Inicio	Descripción
Focal	Sin compromiso de conciencia
	-Con componente motor observable: Motor focal sin marcha Motor focal con marcha (Jacksoniana) Motor focal versiva Motor focal postural Motor focal fonatoria
	- Con manifestaciones subjetivas sensitivas: Somatosensitivo Visual Auditivo Olfatorio Gustativo Vertiginoso
	-Con síntomas o signos autonómicos: Malestar epigástrico Palidez Transpiración Rubor Pilo-erección Dilatación pupilar Taquicardia
	-Con manifestaciones psíquicas: Disfásicos Dismnésicos Cognitivos Afectivos Ilusiones Alucinaciones estructuradas
	Con compromiso de conciencia (Discognitivo)
	Con Evolución a convulsión generalizada bilateral
	Generalizada
Tónico-clónicas	
Mioclónicas	
Ausencias: Típicas / Atípicas	
Atónicas	

Tabla 2: Criterios Diagnósticos de Epilepsia. *Modificado de (6)*

1.- Por lo menos dos crisis no provocadas que ocurren en una separación mayor de 24 horas entre ellas.

2.- Una crisis no provocada y la posibilidad de tener otras crisis similares al riesgo de recurrencia general después de dos crisis no provocadas (aproximadamente 60% o más).

Tabla 3: Fármacos Anticonvulsivantes. *Modificado de (12)*

Fármacos de Primera Generación	Fármacos de Segunda Generación	Fármacos de Tercera Generación
Fenobarbital (PB)	Lamogtrigina (LTG)	Lacosamida (LCM)
Fenitoína (FNT)	Levetiracetam (LEV)	Eslicarbazepina (ESL)
Primidona (PRM)	Topiramato (TPM)	Retigabina (RTG)
Etosuximida (ESM)	Oxcarbazepina (OXC)	
Carbamazepina (CBZ)	Vigabatrina (VGB)	
Ácido Valproico (AVP)	Zonisamida (ZNS)	
Clobazam (CLB)	Tiagabina (TGB)	
Clonazepam (CLN)		

Tabla 4: Mecanismos de Acción de los Fármacos Anticonvulsivantes. Adaptado de (19)

Fármaco	Canales de Acción Voltaje Dependiente					Neurotransmisión		
	I NaT	I NaP	I Ca	I K	I H	GABA	Glu	Presináptico
<i>Fármacos que apuntan a los canales iónicos primariamente</i>								
Fenitoína	+	+	+	+				
Carbamazepina	+		+					
Oxcarbazepina	+		+					
Lamotrigina	+	+	+	+	+			
Ácido Valproico	+	+/-	+			+		
Zonisamida	+		+					
Etoxisimida	-	+	+	+				
<i>Mecanismo Mixto</i>								
Topiramato	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Fármacos que apuntan al metabolismo, liberación o receptores de neurotransmisores</i>								
Levetiracetam								+ (SV2A)
Fenobarbital			+			+		
Benzodiazepinas						+		
Vigabatrina						+		
Tiagabina						+		

Tabla 5: Resultados de estudios que han investigado la relación del polimorfismo C3435T (*rs1045642*) del gen *ABCB1* en la respuesta a FAC

Autor	Año	Población	Resistentes	Respondedores	Resultado
Siddiqui	2003	Reino Unido	200	115	CC>TT OR 2.66
Soranzo	2004	Reino Unido	280	136	CC>TT OR 4.5
Zimprich	2004	Austria	123	87	C>T OR 4.67
Tan	2004	Australia	401	208	No significativo
Seo	2006	Japón	126	84	TT>CC OR 3.64
Chen	2007	China	50	164	No significativo
Hung	2007	China	114	213	CC>TT OR 3.62
Kwan	2007	China	221	297	TT>CC OR 2.5
Shahwan	2007	Irlanda	122	233	No significativo
Dericioglu	2008	Turquía	89	100	No significativo
Ozgon	2008	Turquía	44	53	No significativo
Szoeke	2009	Australia	63	148	No significativo
Szoeke	2009	Escocia	133	152	No significativo
Szoeke	2009	China	11	34	No significativo
Ufer	2009	Alemania	188	103	No significativo
Lakhan	2009	India	94	231	No significativo
Vahab	2009	India	113	54	No significativo
Kim	2009	Corea	198	193	No significativo
Alpman	2010	Turquía	39	92	No significativo
Grover	2010	India	87	125	No significativo
Sanchez	2010	España	111	178	No significativo
Haerian	2011	Asiática	323	362	No significativo
Di Q	2011	China	91	79	No significativo
Dong	2011	China	157	193	No significativo
Kumari	2011	India	125	260	No significativo
Sayyah	2011	Irán	132	200	CC>TT OR 2.17
Emich-Widera	2013	Polonia	60	25	No significativo
Emich-Widera	2014	Polonia	193	135	No significativo
Saygi	2014	Turquía	59	60	No significativo
Seven	2014	Turquía	69	83	No significativo

Tabla 6: Resultados de estudios que han investigado la relación del polimorfismo -24C>T (rs717620) del gen *ABCC2* en la respuesta a FAC

Autor	Año	Población	Resistentes	Respondedores	Resultado
Seo	2008	Japón	133	146	No significativo
Kim	2009	Korea	198	193	No significativo
Ufer	2009	Alemania	118	103	OR 2.15
Ufer	2011	Alemania	176	32	No significativo
Kwan	2011	China	262	328	No significativo
Qu	2012	China	217	320	OR 4.06
Sha'Ri	2014	China -Malasia - India - Japon	987	1069	OR 1.5
Ma CL	2014	China	246	207	OR 1.88
Zhou L	2015	China	156	235	No significativo

Tabla 7: Características Generales

	Pacientes respondedores (n=27)	Pacientes Resistentes (n=23)
Edad, mediana (rango)	27 (16 – 71)	45 (23 – 71)
Edad de inicio, mediana (rango)	15 (3 – 61) <ul style="list-style-type: none"> • < 15 años: 14/27 • > 15 años: 13/27 	9 (1 – 50) <ul style="list-style-type: none"> • <15 años: 18/23 • >15 años: 5/23
Tipo epilepsia (localización según hallazgos al EEG)	Normal: 6/27 (22%) Frontal: 12/27 (44%) Temporal: 7/27 (26%) Generalizada: 2/27 (8%)	Normal: 2/23 (9%) Frontal: 11/23 (48%) Temporal: 9/23 (39%) Generalizada: 1/23 (4%)
Crisis mensuales, mediana (rango)	0 (0-1) <ul style="list-style-type: none"> • 0/mes: 26/27 • 1/mes: 1/27 • >1/mes: 0/27 	3 (1 – 10) <ul style="list-style-type: none"> • 0/mes: 0 • 1/mes: 6/23 • 2-5/mes: 14/23 • >5/mes: 3/23
Tipo de crisis	Parciales Simples: 4/27 (15%) Parciales Complejas: 12/27 (44%) Gen. Primarias: 13/27 (48%) Gen. Secundarias: 5/27 (19%)	Parciales Simples: 2/23 (9%) Parciales Complejas: 15/23 (65%) Gen. Primarias: 6/23 (26%) Gen. Secundarias: 6/23 (26%)

Tabla 8: Fármacos en Uso

	Pacientes Respondedores	Pacientes Resistentes
Número de Fármacos en Uso, Mediana (rango)	1 (1 - 2) <ul style="list-style-type: none"> • 1 fármaco: 23/27 (85%) • 2 fármacos: 4/27 (15%) • ≥ 3 fármacos: 0/27 (0%) 	2 (2 - 5) <ul style="list-style-type: none"> • 1 fármaco: 0/23 (0%) • 2 fármacos: 14/23 (61%) • ≥ 3 fármacos: 9/23 (39%)
Fármacos Clásicos en Uso, Proporción, Dosis media (mg) y rango (mg)	Fenitoína: 7/27, 229 (100 – 400) Carbamazepina: 4/27, 500 (200-600) Ácido Valproico: 14/27, 836 (400-1400) Fenobarbital: 1/27, 150 (150)	Fenitoína: 4/23, 325 (200 – 500) Carbamazepina: 14/23, 985 (700-1500) Ácido Valproico: 10/23, 630 (200-1600) Fenobarbital: 4/23, 125 (100-150)
Fármacos Noveles en Uso, Proporción, Dosis media (mg) y rango (mg)	Lamotrigina: 4/27, 113 (100-150) Levetiracetam: 4/27, 1250 (1000-1500)	Lamotrigina: 7/23, 196 (75-300) Levetiracetam: 7/23, 1700 (1000-3000)
Fármacos Clásicos Utilizados Previamente, Proporción (descartados por falta de efectividad)	Fenitoína: 0/27 Carbamazepina: 2/27 Ácido Valproico: 0/27 Fenobarbital: 0/27	Fenitoína: 12/23 Carbamazepina: 10/23 Ácido Valproico: 6/23 Fenobarbital: 8/23

Tabla 9: Resultados Generales de Genotipificación <i>ABCB1 C3435T (rs 1045642)</i> y <i>ABCC2 c.-24C>T (rs717620)</i>				
<i>ABCB1 C3435T (rs 1045642)</i>				
		CC	CT	TT
Total Pacientes		14 (44)	15 (47)	3 (9)
N (%)				
<i>ABCC2 c.-24C>T (rs717620)</i>				
		CC	CT	TT
Total Pacientes		12 (32%)	24 (65)	1 (3)
N (%)				

Tabla 10: Resultados de Genotipificación <i>ABCB1 C3435T</i> (<i>rs 1045642</i>) y <i>ABCC2 c.-24C>T</i> (<i>rs717620</i>) separados según resistencia a fármacos				
<i>ABCB1 C3435T</i> (<i>rs 1045642</i>)				
		CC	CT	TT
Pacientes Respondedores N (%)	27	7 (32)	12 (55)	3 (13)
Pacientes No Respondedores N (%)	23	7 (35)	13 (65)	0
Controles Sanos N (%)	21	3 (15)	18 (85%)	0
<i>ABCC2 c.-24C>T</i> (<i>rs717620</i>)				
		CC	CT	TT
Pacientes Respondedores N (%)	27	6 (35)	10 (59)	1 (6)
Pacientes No Respondedores N (%)	23	6 (30)	14 (70)	0
Controles Sanos N (%)	21	0	20 (95)	1 (5)

Tabla 11: Comparación de resultados generales con bases de datos internacionales				
<i>ABCBI C3435T (rs 1045642)</i>				
	Total	CC	CT	TT
Pacientes Chilenos N (%)	32	14 (44)	15 (47)	3 (9)
Controles Sanos Chilenos N (%)	21	3 (14)	18 (86)	0
Población Peruana N (%)	86	30 (36)	44 (51)	11 (13)
Población Colombiana N (%)	94	30 (32)	45 (48)	19 (20)
Población Inglesa N (%)	92	20 (22)	46 (50)	26 (28)
Población China Han N (%)	103	43 (42)	42 (41)	18 (17)

Tabla 11: Comparación de resultados generales con bases de datos internacionales (continuación)				
<i>ABCC2 c.-24C>T (rs717620)</i>				
		CC	CT	TT
Total Pacientes N (%)		12 (32)	24 (65)	1 (3)
Controles Sanos Chilenos N (%)	21	0	20 (95)	1 (5)
Población Peruana N (%)	86	73 (85)	12 (14)	1 (1)
Población Colombiana N (%)	94	62 (66)	30 (32)	2 (2)
Población Inglesa N (%)	92	56 (61)	31 (34)	5 (5)
Población China Han N (%)	103	61 (59)	37 (36)	5 (5)

ANEXO 2: FICHA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO

El propósito del presente documento es invitarlo voluntariamente a participar en el estudio titulado “EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES GENÉTICOS EN PACIENTES CON EPILEPSIA RESISTENTE A FÁRMACOS DEL POLICLÍNICO DE NEUROLOGÍA DEL HCVB”, cuyo investigador principal es el Dr. Pablo Moya Vera en conjunto con el Dr. Julio Riquelme Alcázar, Neurólogo del HCVB. Para que usted pueda tomar una decisión informada, se le explicará a continuación cuáles serán los procedimientos involucrados en la ejecución de la investigación, así como en qué consistiría su colaboración:

1. La investigación mencionada se realizará en el policlínico de Neurología del Hospital Carlos Van Buren.
2. A través de esta investigación se determinará la presencia de polimorfismos (diferencias de la secuencia del material genético) en los pacientes epilépticos en control del policlínico, tanto en pacientes que responden a los fármacos (manifiestan un control adecuado de crisis epilépticas) como aquellos en los que falla el control pese al uso de fármacos antiepilépticos.
3. El objetivo de este estudio es entregar información acerca del riesgo de resistencia al uso de fármacos antiepilépticos en pacientes con variaciones de la secuencia del material genético (genoma), de manera de encontrar un examen para determinar el riesgo de resistencia en un paciente epiléptico que comienza un tratamiento con fármacos.
4. **La participación en esta investigación es totalmente voluntaria y quien colabore no recibirá pago alguno por ello.**
5. **Una vez dentro del estudio, usted es libre de desistir de su participación en cualquier momento de la investigación sin tener que dar ninguna explicación al respecto.** La decisión de cancelar su participación no tendrá consecuencias, por lo tanto no significara pérdida de beneficios o atención de salud tanto para usted como para los miembros de su familia. En este ensayo no se utilizan fármacos.
6. El procedimiento consta de **2 etapas**: Una primera etapa en donde se **entrevistará y aplicará una encuesta** al paciente para determinar variables relacionadas con su enfermedad y tratamiento recibido. En una segunda etapa se procederá a la **recolección de una muestra de 5 cc de saliva**. Esta muestra será procesada en el Laboratorio de Farmacogenética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso (Playa Ancha) de manera anónima para determinar la presencia de variaciones del material genético.

7. Los participantes de esta investigación **no se verán expuestos a riesgo** dependiente de la obtención de muestra de saliva por ser una técnica inocua y no invasiva.
8. **La intervención propiamente tal no tendrá costo alguno para el participante.** Los materiales a utilizar para la obtención de muestra correrán por parte del Investigador.
9. **Su decisión de participar o no en esta investigación no interferirá en los servicios que reciba en el policlínico de Neurología del Hospital Van Buren ni el tratamiento que recibe actualmente.**
10. La toma de muestra será realizada en un lugar acordado con anterioridad por parte del Investigador y los pacientes, en el Policlínico del Hospital Van Buren en horario por convenir.
11. **La identidad e información personal del participante se mantendrá confidencial. Nadie sino los investigadores tendrán acceso a verla.**
12. El registro de los datos también será reservado, teniendo acceso a ellos solamente los investigadores.
13. Los hallazgos de esta investigación se publicarán de forma cuantitativa en la investigación realizada, **de forma absolutamente anónima**, para formar parte de la Tesis de Investigación para conducir al grado de Magíster en Ciencias del Investigador. **Ningún dato personal del participante será entregado en dicha publicación.** Los datos obtenidos de forma anónima **podrán ser publicados en una revista científica internacional o utilizados para la realización de otra investigación científica relacionada con el tema.**
14. La muestra de saliva que sobre podrá ser utilizada en estudios posteriores o ser eliminada según su disposición en el consentimiento aparte asociado.

Pablo Moya Vera
RUT: 13199953-4
pablo.moya@uv.cl

Julio Riquelme A
RUT: 16.483.571-5
julio.cra@gmail.com

Valparaíso, de 20....

Ficha de consentimiento informado para participar en la investigación:

“EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES GENÉTICOS EN PACIENTES CON EPILEPSIA RESISTENTE A FÁRMACOS DEL POLICLÍNICO DE NEUROLOGÍA DEL HCVB”.

Yo RUT
..... DECLARO que los investigadores Pablo Moya Vera y Julio Riquelme Alcázar, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, ubicada en Hontaneda N°2653 Valparaíso, me han informado de forma completa en qué consiste la investigación “EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES GENÉTICOS EN PACIENTES CON EPILEPSIA RESISTENTE A FÁRMACOS DEL POLICLÍNICO DE NEUROLOGÍA DEL HCVB”, cuáles son los procedimientos a los que seré sometido y en qué consistirá mi participación. De acuerdo a lo explicado en el consentimiento informado, del que recibí una copia, entiendo que:

1. El objetivo de la investigación es determinar la presencia de marcadores de resistencia al tratamiento de la epilepsia, a través de la evaluación de variaciones del material genético en pacientes en control en el Policlínico de Neurología del Hospital Carlos van Buren.
2. Mi participación será voluntaria y se divide en dos etapas. Primero se realizará una entrevista clínica acerca de la enfermedad y tratamientos efectuados; en una segunda instancia se procederá a tomar una muestra de saliva e hisopado bucal.
3. Los datos obtenidos serán confidenciales, es decir, mi nombre no será dado a conocer. Los resultados podrán ser divulgados en publicaciones de tipo académico-científicas, resguardando mi identidad. Además entiendo que tendré acceso a los resultados, si yo lo requiriera. Por otra parte los datos obtenidos podrán ser utilizados para la realización de otras investigaciones relacionadas con el tema de forma anónima.

4. No recibiré remuneración alguna por participar en este estudio y tampoco tendré que asumir ningún gasto.
5. Podré desistir en mi participación si lo considerara necesario en cualquier momento sin que ello implique perjuicio como paciente del Policlínico.
6. Si me surgiera alguna duda, podré consultarla al Investigador, en cualquier momento de la investigación, a quienes podré contactar a los correos pablo.moya@uv.cl o julio.cra@gmail.com o contactándose con la Secretaria de Neurología del Hospital Carlos van Buren, Teléfono 032-2364000.

De acuerdo a lo declarado por mí en este documento, firmo aceptando mi participación en esta investigación.

PARTE II: Formulario de Consentimiento.

Presto voluntariamente mi consentimiento, luego de haber leído y haber sido informado efectivamente respecto de mis dudas, tengo claro que poseo el derecho a retirarme de la investigación sin que ello pueda ocasionarme ningún perjuicio.

Nombre del participante:
 RUT..... Firma.....
 Teléfono(s) de Contacto:.....

Nombre del Investigador o médico designado.....
 RUT..... Firma.....

Nombre del Delegado o Representante
 RUT..... Firma.....

Valparaíso,.....de 20....