



UTORIZACIÓN PARA LA DIFUSIÓN DE TESIS DIGITAL

Ciudad de México, 25 de 12 de 2023

Por este medio, manifiesto ser el autor de la tesis

Efecto Neuroprotector del Levetiracetam en la Formación Hipocámpica de

Ratas con Epilepsia del Lóbulo Temporal

De la cual ostento la titularidad de los derechos morales y patrimoniales sobre la misma, de conformidad con los artículos 18 y 25 de la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) Así mismo, libero al INP de toda responsabilidad presente o futura que pudiera afectar los intereses de terceros.

Por lo anterior

Autorizo X No autorizo _____

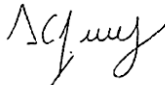
Al Centro de Información y Documentación Científica, su difusión en nuestro **Repositorio Institucional** para efectos de consulta abierta.

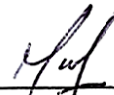
TODO EL MATERIAL CONTENIDO EN ESTA TESIS ESTÁ PROTEGIDO POR La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos México)

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Nombre de Autor (letra de molde) Isabel Arenas Gadea

Nombre de Tutor (letra de molde) Julieta Griselda Mendoza Torreblanca

Firma: 
Sustentante

Firma: 
Tutor de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

Proyecto de Investigación

**EFFECTO NEUROPROTECTOR DEL LEVETIRACETAM EN LA
FORMACIÓN HIPOCÁMPICA DE RATAS CON EPILEPSIA DEL
LÓBULO TEMPORAL**

Presenta

Isabel Arenas Gadea

Asesora Interna

Dra. Beatriz Gómez González
Universidad Autónoma Metropolitana

Asesora externa

Dra. Julieta Griselda Mendoza Torreblanca
Instituto Nacional de Pediatría

A handwritten signature in black ink, appearing to be the name of the external advisor, Julieta Griselda Mendoza Torreblanca.

Ciudad de México, 2023

Este proyecto formó parte del protocolo “Evaluación del efecto neuroprotector, antioxidante y antiinflamatorio del levetiracetam en ratas con epilepsia del lóbulo temporal” con número de registro INP 2022/048.

Agradecimientos

Agradezco al Instituto Nacional de Pediatría (INP), por las facilidades que me brindaron para la elaboración del proyecto, así como los animales, reactivos, materiales y espacios necesarios. Dentro del INP me gustaría agradecer sobre todo a la técnico María Sara Navarrete Hernandez y a la químico Mercedes Edna García Cruz por su ayuda durante mi estancia, pero también a todas las personas del laboratorio de Neurociencias, quienes fueron muy amables y siempre estuvieron dispuestas a brindar su apoyo.

Estos años de formación no habrían sido los mismos sin aquellos profesores y profesoras que me mostraron más allá de un contenido sintético, me dieron su apoyo e hicieron ver las cosas más amenas, demostrando que dentro de lo malo todavía hay personas admirables.

A la Dra. Itzel Jatziri Contreras García por ser una excelente maestra, todas sus enseñanzas me incitaron a querer conocer más e inspiraron para continuar. Agradezco su ayuda y apoyo brindado durante toda la trayectoria del proyecto que, además de instruirme en lo necesario, siempre busco el espacio y tiempo para compartir sus conocimientos. Su exigencia y dedicación son, en gran medida, responsables de todo este esfuerzo.

A la Dra. Julieta Griselda Mendoza Torreblanca por aceptarme en el INP, por su dedicación al proyecto y por todo el aprendizaje que me dejó, fue una grata experiencia poder trabajar con ella. Siempre le voy a estar agradecida por el tiempo que me otorgó para que este proyecto fuera posible.

A Gerson quien estuvo en el laboratorio conmigo, con él puede crecer de muchas maneras y aprender cosas nuevas. El apoyo mutuo generó un espacio lleno de experiencias que siempre voy a recordar con alegría. Además de ser mi compañero de laboratorio es un gran amigo.

A la Dra. Beatriz Gómez González por la asesoría de este trabajo y apoyar la investigación.

A la Dra. Adriana Pichardo, de quién pude aprender técnicas necesarias para la elaboración del proyecto. Siempre tuvo la mejor disposición, además proporcionó reactivos y muestras que fueron indispensables para la elaboración del proyecto.

Dedicatoria

La presente tesis se debe, en gran parte, a las personas que me han acompañado y brindado su apoyo en todos estos años. Aprecio poder tener personas tan maravillosas a mi alrededor, por esta razón les dedico este trabajo de investigación.

A mi familia, con quiénes estaré eternamente agradecida por posibilitar mi formación académica y apoyarme a lo largo de estos años. Son una gran parte de mí y siempre me dieron la fuerza para seguir adelante. Rosibel, Jordi, Joan, Nilo, Adriana y Musa, todo lo logrado es un reflejo de sus enseñanzas, acompañamiento y sabiduría.

A todas mis amigxs por salvarme en más de un aspecto, sin ellxs no hubiera podido continuar en aquellos momentos donde sentía que no podía más. Su amor y cariño siempre fueron la inspiración en mi vida. Todos los momentos compartidos son parte importante de mí; siempre les voy a agradecer lo vivido a su lado.

A Lilith, te extraño cada día.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	9
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	12
1. Epilepsia	12
1.1. Crisis epilépticas	13
1.2. Epilepsia del lóbulo temporal	14
1.3. Modelo animal ELT	15
1.4. Formación hipocámpica y el circuito trisináptico	16
2. Neurodegeneración y ELT	19
3. Levetiracetam	20
3.1. Levetiracetam y neuroprotección	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
JUSTIFICACIÓN	26
OBJETIVOS	26
1. Objetivo general	26
2. Objetivos particulares	26
HIPÓTESIS	27
UBICACIÓN DEL ESTUDIO	27
DISEÑO EXPERIMENTAL	27
1. Diagrama de flujo	28
2. Línea del tiempo	28
MATERIAL Y MÉTODOS	29
1. Población	29
2. Inducción del EE	29
3. Registro de CER	30
4. Tratamiento con LEV	31
5. Implantación de las minibombas osmóticas	31
6. Obtención del tejido	32
7. Inmunohistoquímica	32
8. Tinción con Fluoro-Jade B	33
9. Cuantificación celular	33

10. Análisis estadístico -----	33
RESULTADOS -----	34
1. Tinción de Fluoro-Jade B -----	34
2. Inmunohistoquímica NeuN -----	36
DISCUSIÓN -----	40
CONCLUSIÓN -----	44
REFERENCIAS -----	44
ANEXOS -----	52

ABREVIATURAS

BH: Barrera hematoencefálica
CER: Crisis espontáneas recurrentes
CTRL + LEV: Control tratado con LEV
CTRL: Control
DAB: 3,3'-diaminobencidina
DZP: Diazepam
EE: Estado epiléptico
EEG: Electroencefalograma
ELT: Epilepsia del lóbulo temporal
EPI + LEV: Epiléptico tratado con LEV
EPI: Epiléptico
FAE: Fármaco antiepiléptico
FJB: Fluoro-Jade B
FJC: Fluoro-Jade C
FH: Formación hipocampal
GABA: Ácido gamma amino butírico
GD: Giro dentado
GFAP: Proteína ácida fibrilar glial
GSH: Glutación
i.m: Intramuscular
i.p: Intraperitoneal
iNOS: Sintasa de óxido nítrico inducible
INP: Instituto Nacional de Pediatría
LEV: Levetiracetam
NeuN: Proteína nuclear específica de neurona
NMDA: N-metil-D-aspartato
PB: Amortiguador de fosfatos
PBT: Amortiguador de fosfatos con tritón
SFB: Suero Fetal Bovino
SNC: Sistema nervioso central
SSI: Solución salina isotónica
std: Error estandar

SV2A: Proteína de vesículas sinápticas 2A

Tp53: Proteína tumoral 53

UAM: Universidad Autónoma Metropolitana

UEITMA: Unidad de Equipos para Investigación Translacional en Modelos Animales

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Modelo animal de la epilepsia del lóbulo temporal inducida con litio y pilocarpina. -----	16
Figura 2. Anatomía de la formación hipocámpica: Hipocampo y Giro dentado. -----	17
Figura 3. Circuito trisináptico de la formación hipocámpica. -----	18
Figura 4. Diagrama de flujo del diseño experimental. -----	28
Figura 5. Línea del tiempo del diseño experimental. -----	28
Figura 6. Tinción de Fluoro-Jade B de CA1, en cortes sagitales de la formación hipocámpica de ratas. -----	34
Figura 7. Cuantificación de las células FJB+ de la capa CA1 de la formación hipocámpica de ratas. -----	35
Figura 8. Tinción de Fuoro-Jade B del Hilus y CA3, en cortes sagitales de la formación hipocámpica de ratas. -----	36
Figura 9. Cuantificación de las células FJB+ del Hilus y CA3 de la formación hipocámpica de ratas. -----	36
Figura 10. Inmunohistoquímica de NeuN de la capa CA1, en cortes sagitales de la formación hipocámpica de ratas. -----	37
Figura 11. Inmunohistoquímica de NeuN de CA3, en cortes sagitales de la formación hipocámpica de ratas. -----	38
Figura 12. Cuantificación de la densidad óptica relativa de células NeuN positivas en CA1, CA3 e Hilus de la formación hipocámpica de ratas. -----	38
Figura 13. Inmunohistoquímica de NeuN de la capa granular e Hilus, en cortes sagitales de la formación hipocámpica de ratas. -----	39
Figura 14. Cuantificación de la densidad óptica relativa de células NeuN positivas en la capa granular de la formación hipocámpica de ratas. -----	39

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Escala de Racine -----	30
--	----

RESUMEN:

La epilepsia es una enfermedad neurológica crónica, con predisposición a la ocurrencia de crisis epilépticas espontáneas y recurrentes. La epilepsia del lóbulo temporal (ELT), epilepsia de origen focal más común, tiene como característica histopatológica la esclerosis mesial temporal con pérdida de neuronas en la formación hipocámpica (FH) y gliosis reactiva. Se han desarrollado diversos modelos para el estudio de la ELT, uno de ellos es el de litio-pilocarpina en donde también se observa la atrofia de la FH y tres fases de la progresión de la enfermedad. Una fase aguda en donde se induce el EE, una fase libre de crisis denominada epileptogénesis y una fase crónica en donde se pueden observar la presencia de crisis convulsivas espontáneas y recurrentes (CER). Se sabe que durante la fase aguda y de epileptogénesis hay neurodegeneración en la FH, aunque sigue en controversia si este proceso continúa durante la fase crónica de la ELT.

Se ha demostrado que el levetiracetam (LEV), un fármaco antiepiléptico eficaz en el control de las crisis, tiene efectos neuroprotectores en la fase aguda y de epileptogénesis en el modelo animal de ELT, así como en modelos de isquemia, traumatismo craneoencefálico y diabetes. Aunque su efecto neuroprotector durante la fase crónica de la ELT sigue siendo un tema de investigación. Por lo tanto, en este estudio se evaluó el efecto neuroprotector del LEV en la FH de ratas con ELT durante la fase crónica.

Se realizó la inducción del estado epiléptico (EE) en ratas Wistar para posteriormente, durante la fase crónica de la enfermedad, tratarlas con LEV y evaluar la neurodegeneración utilizando la tinción de Fluoro-Jade B (FJB, para determinar muerte celular) y mediante la inmunoreactividad a la proteína nuclear específica de neurona (NeuN, para determinar sobrevivencia neuronal). En la FH de ratas epilépticas se encontraron células FJB⁺ (en proceso de neurodegeneración) durante la fase crónica, en relación con esto la sobrevivencia neuronal disminuyó cualitativamente. El LEV redujo la cantidad de células FJB⁺, e incrementó la sobrevivencia neuronal de manera cualitativa, en comparación con las ratas epilépticas que no fueron tratadas. Esto indica que durante la fase crónica de la ELT

continúa la neurodegeneración, y el LEV puede actuar como un fármaco neuroprotector al disminuir la muerte neuronal de la FH.

INTRODUCCIÓN:

1. Epilepsia

La epilepsia es una enfermedad neurológica crónica de etiología diversa, caracterizada por la predisposición a la ocurrencia de crisis epilépticas espontáneas y recurrentes (CER). Dichas crisis son la manifestación física de una interrupción temporal de la función cerebral normal, debido a una descarga eléctrica excesiva de redes neuronales localizadas en estructuras corticales y subcorticales. Las manifestaciones clínicas son muy variables y dependen del área involucrada, entre las cuales se incluyen alteraciones en la conciencia, en la función motora y en la percepción sensorial (Izquierdo, 2005; Stafstrom, 2010; Stafstrom, 2004).

Una crisis no hace la epilepsia. Para diagnosticar a un paciente con epilepsia se necesita la presencia de al menos dos crisis no provocadas con más de 24 horas entre ellas (Fisher et al., 2014; Sirven & Osborne, 2014; Stafstrom, 2004). Esta enfermedad puede deteriorar la calidad de vida de los pacientes debido a las crisis, los trastornos psiquiátricos y de estado de ánimo comórbidos, los déficits cognitivos y los efectos adversos de los medicamentos, etc. (Devinsky et al., 2018). Por otra parte, se estima que la epilepsia afecta a más de 50 millones de personas alrededor del mundo (World Health Organization [WHO], 2022); mientras que en México se calcula que son entre 349 y 680 pacientes por cada 100 000 habitantes en población general, y en la población infantil son 180 a 400 paciente que padecen esta condición por cada 100 000 habitantes (Cruz-Cruz et al., 2017).

Las causas de la epilepsia, en su mayoría, son desconocidas, aunque en algunos casos pueden presentarse debido a afectaciones estructurales, genéticas, infecciosas, metabólicas e inmunes, por ejemplo (Stafstrom, 2004):

- Daño cerebral causado durante las etapas prenatales o perinatales.
- Anomalías congénitas o condiciones genéticas que se asocian con malformaciones del cerebro.
- Trauma craneoencefálico.
- Derrame cerebral.
- Infecciones en el cerebro (meningitis, encefalitis o neurocisticercosis).
- Tumor cerebral.

- Síndromes genéticos.

Existen tratamientos con fármacos antiepilépticos (FAEs), los cuales van dirigidos a disminuir la excitabilidad neuronal, ayudando en el control de las crisis. Se ha observado que algunos pacientes están libres de crisis aún en ausencia de algún FAE, sin embargo, pueden seguir presentando cambios en el electroencefalograma (EEG). Actualmente se considera que la epilepsia está resuelta cuando un individuo se ha mantenido libre de crisis epilépticas en los últimos 10 años, sin usar FAEs en los últimos 5 años y tiene un EEG sin alteraciones, o cuando la persona ha superado la edad de un síndrome de epilepsia dependiente de la edad (Fisher et al., 2014).

1.1. Crisis epilépticas

Las crisis epilépticas son una interrupción temporal de las funciones cerebrales, las manifestaciones clínicas pueden incluir alteración en la función motora, la sensación, el estado de alerta, la percepción, funciones autónomas, o alguna combinación (Stafstrom, 2004). Su frecuencia puede variar dependiendo de cada persona, pero pueden presentarse desde menos de una al año o hasta varias veces por día (WHO, 2022). Algunas de las crisis están acompañadas de movimientos involuntarios, que incluyen partes o todo el cuerpo, y en ocasiones puede haber pérdida de la consciencia y del control de las funciones del intestino o vejiga (WHO, 2022).

Además, como se mencionó anteriormente, las crisis epilépticas son episodios en los que hay actividad neuronal anormal, debido a la hiperexcitabilidad e hipersincronía. La hiperexcitabilidad es la respuesta anormal (por ejemplo: umbral más bajo) de una neurona a la entrada de información excitadora. Una neurona hiperexcitable tiende a disparar ráfagas de múltiples potenciales de acción en lugar de solo uno o dos. Mientras que la hipersincronía se refiere al reclutamiento de un gran número de neuronas vecinas en un modo de disparo anormal, que conlleva a la propagación de estas descargas a otras neuronas vecinas y distantes. En última instancia, una crisis es un fenómeno en red que requiere la participación de muchas neuronas que se activan sincrónicamente (Stafstrom, 2010; Rho, et al., 2010). Es importante controlar las crisis epilépticas, ya que, de no ser así, estas causan daño neurodegenerativo progresivo en el paciente, que puede manifestarse en pérdida neuronal, gliosis,

neurogénesis anormal, reinervación axonal y otras consecuencias aún desconocidas (Feria-Romero et al., 2013).

Las crisis epilépticas se pueden clasificar de acuerdo al inicio de su actividad neuronal anormal como: crisis de origen focal, crisis de origen generalizado y crisis de origen desconocido. Las crisis focales son aquellas en las que el inicio de la actividad anormal se localiza en una región específica del encéfalo y, por consiguiente, las manifestaciones clínicas se relacionan con esa área. Las descargas epilépticas focales pueden, o no, propagarse hacia áreas adyacentes y eventualmente incluir a todo el encéfalo (Izquierdo, 2005). Por otra parte, en las crisis generalizadas la actividad eléctrica anormal comienza de manera simultánea en ambos hemisferios, y las manifestaciones clínicas se pueden presentar desde una breve alteración de la conciencia hasta movimientos espasmódicos de todas las extremidades que son acompañados de pérdida de la postura y de la conciencia (Stafstrom & Rho, 2004). Por último, en las crisis de inicio desconocido, como su nombre lo indica, se ignora en dónde se encuentra el origen del inicio de la actividad neuronal anormal (Scheffer et al., 2017).

1.2. Epilepsia del lóbulo temporal

La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es el tipo de epilepsia de origen focal más común en humanos, y en la que mayor cantidad de pacientes desarrollan tolerancia a tratamientos con FAEs, pues llega a cerca del 30% (Thom, 2014). Entre las principales características de la ELT está la esclerosis temporal mesial, caracterizada por la atrofia de la formación hipocámpica (FH), acompañada de pérdida neuronal y proliferación de células gliales (Curia, et al., 2008). De manera subsecuente se producen circuitos aberrantes en las sinapsis que se llevan a cabo en la FH, dispersión de las neuronas granulares, alteraciones en las interneuronas, así como reinervación de las fibras musgosas (Malmgren & Thom, 2012). Asimismo, las comorbilidades incluyen déficits cognitivos, tales como problemas en los procesos de memoria y aprendizaje (Holmes, 2015), por eso, su estudio ha ido en aumento y se considera de gran importancia.

Dentro de las características fisiopatológicas fundamentales de la ELT se encuentra el desbalance del sistema de inhibición (mediada por ácido gamma-aminobutírico, GABA) y excitación (mediada por glutamato), a favor del último, además de la hiperexcitabilidad y la hipersincronía neuronal (López-Meraz, et al., 2009; Stafstrom, 2004). Por lo general, se produce de manera secundaria a una lesión cerebral inicial, la cual puede deberse a traumas craneoencefálicos, tumores, encefalitis o estado epiléptico (EE). Posteriormente viene un periodo de latencia, conocido como epileptogénesis, donde se lleva a cabo un proceso dinámico que altera de manera progresiva la excitabilidad neuronal, asimismo se establecen interconexiones celulares anormales o aberrantes. Dicho periodo termina antes de que ocurra la aparición de la primera crisis espontánea, dando lugar a la fase crónica de la enfermedad. En este punto aparecen las crisis epilépticas, causadas por la prolongación masiva del disparo neuronal, lo que provoca un cambio que puede ser visualizado en un registro de EEG (Téllez-Zenteno & Hernández-Ronquillo, 2011).

1.3. Modelo animal ELT

Para el estudio de la ELT se han desarrollado modelos animales, sobre todo en roedores, que simulan algunos de los signos que se presentan en la epilepsia en humanos, como los cambios producidos a nivel del EEG y la presencia de CER. Asimismo, empleando estos modelos, se reproduce con alta fidelidad las características histopatológicas observadas en pacientes con esta enfermedad. Existen diversas maneras de provocar la ELT, uno de los modelos más empleados en la actualidad es el establecido por Turski et al., en 1983, en el cual se utilizaban altas dosis de pilocarpina (300 a 350 mg/Kg), para inducir el EE. En nuestro caso, para reducir la cantidad de pilocarpina e incrementar su eficiencia, se administra primero litio.

El litio es un fármaco usado generalmente para estabilizar el humor en las enfermedades maniaco-depresivas (Curia et al., 2008). En el modelo de ELT, es administrado entre 18 y 24 horas antes de la pilocarpina, y permite la inducción del EE con menores dosis de esta (30 a 60 mg/Kg), debido a que sensibiliza a las células haciendo que sea más fácil llevarlas a un estado hiperexcitado (Jope, et al., 1986). La pilocarpina es un agonista de los receptores muscarínicos que genera un aumento en

la liberación de glutamato produciendo un incremento en la excitabilidad celular lo que lleva al EE. Asimismo, el glutamato, al unirse a su receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), produce un influjo excesivo de calcio en las neuronas provocando excitotoxicidad, activación de enzimas, cambios en la expresión de genes, producción de radicales libres, y posteriormente la muerte celular (Scorza, et al., 2009; Cavalheiro, et al., 2006).

La pilocarpina induce rápidamente el EE, además produce daño cerebral estructuralmente similar al que se encuentra en las autopsias de pacientes con ELT (Curia et al., 2008; Leite et al., 1990). Asimismo, en este modelo, al igual que con ELT en humanos, existen tres periodos de desarrollo de la enfermedad: se comienza con una lesión inicial, a lo que se le denomina fase aguda, en donde se induce el EE con la pilocarpina; continúa la epileptogénesis o periodo latente, libre de crisis; para llegar a la fase crónica donde se presentan las CER (Curia, et al., 2008; Scorza, et al., 2009). En la figura 1 se puede apreciar esquemáticamente el modelo completo.

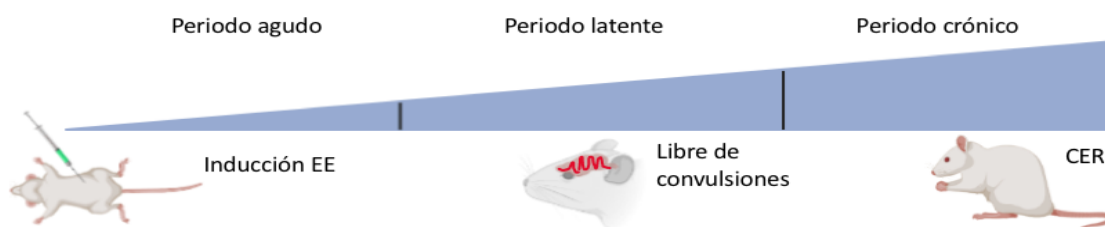


Figura 1. Modelo animal de la epilepsia del lóbulo temporal inducida con litio y pilocarpina. Comienza con el periodo agudo donde se induce el estado epiléptico (EE) al administrar pilocarpina, posteriormente, viene el periodo latente (o epileptogénesis) libre de convulsiones, y por último el periodo crónico en el que se presentan las crisis espontáneas y recurrentes (CER). La figura se realizó con el programa BioRender.

Las ratas desarrollan lesiones que principalmente afectan a la FH, amígdala, tálamo y corteza piriforme. Además, se generan cambios funcionales y estructurales en las redes neuronales como la reorganización sináptica, con un crecimiento aberrante (sprouting) de axones (fibras musgosas) de células granulares, asociada a la formación de un circuito excitador reverberante que subyacen a las CER (Cavalheiro, et al., 2006; Clifford et al., 1987; Faure et al., 2013).

1.4. Formación hipocámpica y el circuito trisináptico

Como ya se mencionó, la atrofia de la FH es una de las características histopatológicas de la ELT, por ello la FH es de gran relevancia y un importante tópico

de estudio. La FH ha sido una de las regiones más estudiadas en la ELT, y para fines de esta investigación, se estudiará dicha región. Esta estructura deriva de la región medial del telencéfalo, forma parte del sistema límbico y tiene un papel importante en la adquisición del aprendizaje espacial, y la consolidación de la memoria a largo y corto plazo (Hernández, et al., 2015).

Anatómicamente, la FH se compone de dos tipos de células principales, piramidales y granulares, que forman configuraciones entrelazadas. Las células piramidales se localizan en lo que propiamente se denomina hipocampo (cuerno o asta de Ammón), que se ha subdividido por diferencias en el tamaño y la densidad de estas células en tres subregiones (CA1, CA2 y CA3), además, existen dos regiones aledañas el *stratum oriens* y el *stratum radiatum*; asimismo, en CA1, se encuentra presente el *stratum lacunosum moleculare* y en CA3 el *stratum lucidum*. Mientras que en el giro dentado (GD) que consta de tres capas, una capa granular, una molecular y el Hilus, se encuentran las células granulares, las principales neuronas del GD, localizadas en la capa granular (Amaral & Lavenex, 2007; Gilbert & Burdette 1995; Sloviter, 2008; Dekeyzer, et al., 2017). Las diferentes capas que componen al hipocampo y GD se representan en la figura 2.

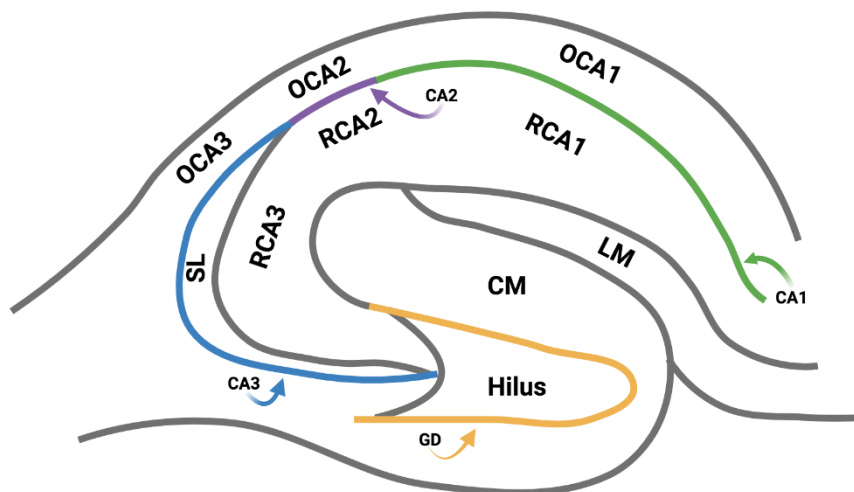


Figura 2. Anatomía de la formación hipocámpica: Hipocampo y Giro dentado. Las tres subregiones del hipocampo se componen por el *stratum oriens*, la capa piramidal (mostrada de color azul para CA3, morado para CA2 y verde para CA1) y el *stratum radiatum*; además, por debajo de CA1 se localiza el *stratum lacunosum moleculare* y junto a CA3 el *stratum lucidum*. El giro dentado, a su vez, se compone de la capa molecular, capa granular (representada de color amarillo) y el Hilus. OCA1: *stratum oriens* de CA1, OCA2: *stratum oriens* de CA2, OCA3: *stratum oriens* de CA3, RCA1: *stratum radiatum* de CA1, RCA2: *stratum radiatum* de CA2, RCA3: *stratum radiatum* de CA3, LM: *stratum lacunosum moleculare*, SL: *stratum lucidum* y CM: capa molecular. La figura se realizó en el programa BioRender.

La FH se ha considerado tradicionalmente como un circuito trisináptico unidireccional de transmisión en serie. Este circuito trisináptico inicia en la vía perforante de la corteza entorrinal; los axones de las neuronas en la corteza entorrinal se unen formando la vía perforante para conectar medialmente el eje longitudinal del hipocampo con las neuronas granulares. Al entrar en el GD, las fibras de la vía perforante hacen sinapsis con las dendritas de las neuronas granulares dentadas, formando el primer enlace en el circuito trisináptico. Posteriormente, a través de las fibras musgosas (axones de las neuronas granulares), las neuronas granulares hacen contactos sinápticos sobre las dendritas apicales de las células piramidales de CA3, las cuales a su vez, envían sus axones hasta las neuronas piramidales de la región CA1 mediante las colaterales de Schaffer. El circuito termina cuando las células piramidales de CA1 envían la información de regreso a la corteza entorrinal (Gilbert & Burdette 1995; Hernández, et al., 2015; Andersen, et al., 2006). Este circuito se encuentra representado en la figura 3.

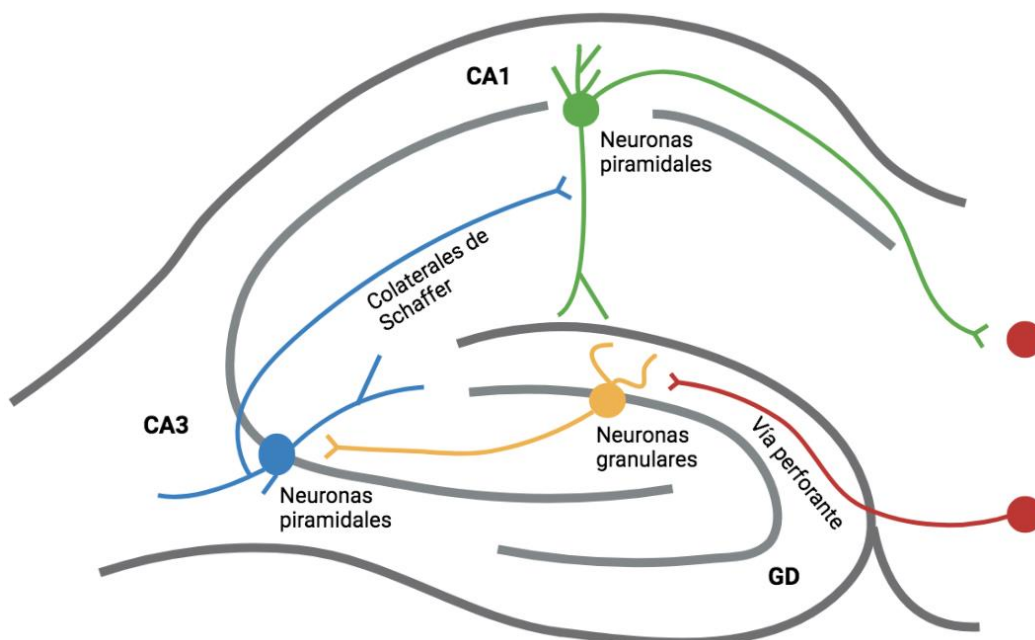


Figura 3. Circuito trisináptico de la formación hipocámpica. Comienza en la corteza entorrinal que a través de la vía perforante (circuito rojo) llega a las dendritas de las neuronas granulares (representadas de color amarillo) en la circunvolución dentada. De ahí los axones de las neuronas granulares (fibras musgosas) hacen contacto con las dendritas de las neuronas piramidales de CA3 (círculo azul), donde la colateral de Schaffer (axones de las células piramidales CA3) hacen sinapsis en las dendritas apicales de las células piramidales CA1 (color verde). Por último, los axones de las neuronas piramidales de CA1 hacen contacto con las neuronas de la corteza entorrinal (círculo rojo). Figura modificada de Gilbert & Burdette 1995, utilizando el programa BioRender.

2. Neurodegeneración y ELT

Diversos estudios han dado a conocer que las crisis epilépticas son capaces de causar muerte neuronal, lo que se relaciona con la disfunción cognitiva, así como con dificultades de memoria, atención y aprendizaje de algunos pacientes (Holmes, 2015). El insulto epileptógeno, presente al inicio de la enfermedad, genera la muerte neuronal aguda y tardía, mediante apoptosis y necrosis, para dar lugar a la gliosis (Feria, et al., 2013; Cavalheiro, et al., 2006). En pacientes con ELT se presentan alteraciones morfológicas en la FH, incluyendo una importante cantidad de neuronas muertas; la alteración más observada es la pérdida masiva de neuronas en el Hilus del GD y en las células piramidales de las capas CA1 y CA3 (Pereno, 2010; Cid, et al., 2021).

Asimismo, en el modelo animal de ELT inducida con litio y pilocarpina, el EE produce daño neuronal debido a la muerte celular en la FH, la amígdala y la corteza entorrinal, con pérdida tanto de las células principales como de las interneuronas. El daño general ocurre en varias áreas del cerebro y tiene un curso de tiempo específico en cada área diferente (Covolan y Mello, 2000), que continúa incluso algunos meses después de la inducción del EE (Cavalheiro, et al., 2006). Es importante mencionar que algunas poblaciones neuronales son más propensas que otras al daño neuronal. Las primeras células en ser afectadas son neuronas de las áreas subcorticales, la corteza piriforme, neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, e interneuronas hilares (Scorza et al., 2009).

Con la administración de pilocarpina se produce la liberación excesiva de glutamato, provocando una entrada masiva de Ca^{2+} en las neuronas postsinápticas, que a su vez activa proteasas, lipasas, sintasas de óxido nítrico, endonucleasas y principalmente radicales libres que inducen la muerte celular (Scorza, et al., 2009). Se ha observado que las crisis graves y repetidas (como en el EE) causan daño cerebral, a menudo con muerte neuronal extensa. Asimismo, las crisis más prolongadas características de la ELT, como las crisis parciales complejas tradicionales (crisis focales discognitivas), que pueden progresar a crisis convulsivas tónico-clónicas, tienen más probabilidades de conducir a la pérdida neuronal (Dingledine, et al., 2014). También se ha observado que durante la epileptogénesis continúan activas algunas de las vías

de muerte celular, como la apoptosis, contribuyendo a la neurodegeneración en dicho periodo (Henshall & Simon, 2005). Pero todavía existe controversia con respecto a si las crisis breves aisladas, como las CER, contribuyen a la muerte neuronal continuando con el proceso de neurodegeneración en la fase crónica de la epilepsia (Dingledine, et al., 2014; Walker, 2007). Existen varios estudios de imagen en modelos experimentales y humanos que sustentan la idea de que algunos tipos de crisis pueden causar neurodegeneración debido a la muerte neuronal que se produce. Pero se han publicado diversos trabajos con animales e imágenes de pacientes, con seguimiento a largo plazo, que ponen en duda lo anterior (Feria, et al., 2013).

3. Levetiracetam

El levetiracetam (LEV) es un FAE de segunda generación y de amplio espectro, prescrito para el tratamiento de las crisis parciales de pacientes con ELT. Tiene una alta eficacia y tolerabilidad en comparación con otros medicamentos, por eso en los últimos años se ha incrementado su uso; se utiliza, como coadyuvante o como monoterapia, en el tratamiento de crisis parciales con o sin generalización secundaria, en niños y adultos (Howard, et.al., 2018; Deshpande & DeLorenzo, 2014; Johannessen & Patsalos, 2010).

Aunque todavía no se conoce por completo, y a diferencia de otros FAEs, se ha postulado que el LEV tiene un novedoso mecanismo de acción a través de la unión con la proteína de vesículas sinápticas 2A (SV2A), una proteína integral de membrana que se encuentra presente en todas las vesículas sinápticas. Así, el LEV participa en la modulación de la liberación de los neurotransmisores mediada por calcio (Lyseng-Williamson, 2011). Estudios de fijación de voltaje de célula completa indican que, a través del reciclado vesicular y la endocitosis, el LEV ingresa a la vesícula sináptica para unirse a la proteína SV2A, provocando que el proceso de fusión vesicular se disminuya en algún punto, produciendo un menor número de vesículas que liberen su contenido, y por ende, una reducción en la transmisión sináptica (Contreras-García et al., 2022; Meehan et al., 2011; Pichardo-Macías et al., 2016).

Se ha propuesto que las acciones del LEV son moduladas por la actividad neuronal y la expresión de SV2A; ya que se ha observado que el LEV reduce la amplitud de

corriente postsináptica, preferentemente en neuronas con una tasa de disparo de alta frecuencia. Aunque todavía se desconocen los mecanismos exactos ejercidos por el LEV para reducir la excitabilidad, la proteína SV2A es fundamental. Dicho fármaco es hidrosoluble y para unirse a SV2A ingresa a las células a través del reciclaje vesicular, durante la endocitosis. Entre mayor sea la actividad sináptica y se incremente el reciclamiento vesicular, el efecto del LEV aumenta debido a que habrá más fármaco dentro de las células. Esto es de gran importancia, ya que de esta manera su efecto se vuelve finamente modulado y específico, reduciendo la hiperexcitabilidad e hipersincronía neuronal de la zona afectada (Meehan, et al., 2011; Meehan, et al., 2012). De igual forma se ha observado que la respuesta de los pacientes al tratamiento varía, y se sugiere que la expresión de la proteína SV2A influye en la eficacia del LEV. Aquellos pacientes que presentan una mayor concentración en SV2A, tienen un mejor control de las crisis al ser tratados con LEV (De Groot, et al., 2011). Debido a que la eficacia de LEV parece depender de la unión a SV2A (Meehan, et al., 2011), cambios en su expresión podría perjudicar la respuesta al tratamiento.

Además de la unión con la proteína SV2A, el LEV puede modular la actividad neuronal mediante otras vías que permiten el control de las crisis epilépticas. Wakita y cols., demostraron que el LEV disminuye la supresión inducida por Zn^{2+} de los receptores $GABA_A$, incrementando la transmisión inhibitoria mediada por GABA. Se ha observado que el Muscimol, un agonista del receptor $GABA_A$, afecta y controla la liberación de glutamato, dando como resultado una pérdida presináptica en la transmisión excitatoria; la transmisión inhibitoria disminuye la excitabilidad mediada por glutamato (Wakita, et al., 2013). En el hipocampo de cerebros epilépticos, la función del receptor de $GABA_A$ puede verse afectada por la inhibición alostérica del Zn^{2+} , es decir, actúa como modulador negativo del receptor, lo que reduce el efecto inhibitorio de GABA sobre la transmisión excitatoria. Este efecto, provocado por el Zn^{2+} en los receptores $GABA_A$, puede revertirse mediante la aplicación aguda de LEV en neuronas del hipocampo (Surges, et al., 2008; Rigo, et al., 2002). Asimismo, el LEV puede modular la actividad neuronal mediante la inhibición del aumento de Ca^{2+} intracelular (a través del bloqueo de la liberación de Ca^{2+} de las reservas intraneuronales y de los canales de Ca^{2+} de tipo N y P/Q), con corrientes rectificadoras retardadas de K^+ , el intercambiador Cl^- / HCO_3^- , y receptores AMPA (Surges, et al., 2008; Chen, et al., 2018). Con esto se puede decir que el LEV presenta diversos

objetivos moleculares a través de los cuales ejerce su efecto. Estas vías pueden converger para disminuir la despolarización postsináptica, la acumulación de calcio, la excitotoxicidad, la muerte celular y la inflamación. Si bien los mecanismos exactos todavía no se comprenden por completo, la integración de todos los puntos mencionados anteriormente puede explicar la capacidad de LEV para producir beneficios en múltiples modelos, indicando un efecto potente que puede ser de gran ayuda en el tratamiento de pacientes (Browning, et al., 2016; Contreras-García et al., 2022).

3.1. Levetiracetam y neuroprotección

La neuroprotección se refiere a los mecanismos que se activan para prevenir el daño neuronal. Los agentes antiepilépticos pueden alterar los circuitos neuronales haciéndolos menos propensos a las crisis, mientras que los agentes neuroprotectores pueden reducir el daño que provocan las crisis (Klitgaard & Pitkänen, 2003). Los FAEs comúnmente usados, están dirigidos a detener la crisis, suprimiendo la excitabilidad neuronal, aunque esto podría ser insuficiente ya que, por lo general, no cubren las comorbilidades que presentan los pacientes epilépticos. Por esa razón se ha intentado desarrollar nuevos fármacos que puedan proteger al cerebro evitando el deterioro, al mismo tiempo que controlan las crisis epilépticas (Contreras-García et al., 2022; Klitgaard & Pitkänen, 2003). Investigaciones sugieren que el LEV posee propiedades neuroprotectoras en ambas condiciones (no epilépticas y epilépticas) aminorando el proceso epileptogénico y la muerte neuronal, además de las características anticonvulsivas que se le atribuyen. Se ha observado que el LEV es capaz de evitar la muerte neuronal al disminuir el número de crisis epilépticas (Scorza, et al., 2009). Asimismo, puede inhibir la hiperexcitación neuronal cuando la actividad epileptiforme se evoca en el hipocampo de ratas, actuando como un buen fármaco anticonvulsivo (Margineanu & Klitgaard, 2000). Aunado a esto, se han realizado estudios para demostrar los efectos neuroprotectores en diversos niveles.

Durante la fase aguda de la epilepsia, el LEV puede prevenir o revertir las reorganizaciones de los circuitos neuronales que se producen después de la inducción de EE, previniendo el deterioro progresivo del proceso epiléptico, y atenúa tanto la muerte de las células como los cambios en la excitabilidad de la FH después de la aplicación de pilocarpina. Altas dosis de LEV antes de la inducción del EE

protegen al cerebro contra el desarrollo citotóxico y contra la pérdida de células neuronales (Klitgaard & Pitkänen, 2003). De igual manera, la administración de LEV, 2 horas después de la inducción del EE con pilocarpina, tiene un efecto neuroprotector que impide la muerte neuronal en CA1, CA3 e Hilus del GD. El número de células positivas para Fluoro-Jade B (FJB), neuronas en degeneración, se redujó significativamente con la administración de LEV a altas dosis (150 mg), y fue significativamente eficaz para proteger el daño neuronal posterior al EE en comparación con diazepam (DZP) y valproato. Sin embargo, el LEV como fármaco complementario con DZP no pudo aliviar el daño neuronal (Lee, et al., 2013).

Itoh y colaboradores (2015) observaron en ratas que, después de detener el EE con DZP, el tratamiento repetido con dosis altas de LEV (500 mg/Kg) previno el desarrollo de las CER y la muerte neuronal por al menos 28 días. Se demostraron así los efectos neuroprotectores de dicho fármaco, al disminuir la muerte neuronal y su efecto en la prevención del desarrollo de la epilepsia, aunque las dosis bajas (250 mg/Kg) no fueron efectivas. Asimismo, el tratamiento con LEV protegió contra la secuencia de eventos excitotóxicos inducidos por el edema vasogénico (Itoh, et al., 2015; Itoh, et al., 2016).

Además, el LEV puede interferir con el proceso de epileptogénesis, al reducir el desarrollo, la gravedad y la duración de las crisis inducidas por la estimulación eléctrica de la amígdala con el kindling eléctrico (Löscher, et al., 1998; Willmore, 2005; Stratton, et al., 2003). El efecto antiepileptógeno se alcanza a dosis que no inducen efectos adversos sedantes o tóxicos. Se ha observado que el LEV no solo ejerce su acción a través de una acción anticonvulsiva, sino que posee un verdadero efecto antiepileptógeno, debido a que cuando se detuvo el tratamiento los efectos benéficos se mantuvieron. Con esto se propone que el LEV podría servir para la prevención de la epilepsia en pacientes que tienen un alto riesgo prospectivo de desarrollar ELT tras un traumatismo craneoencefálico, por lo tanto, se puede decir que el LEV tiene efectos neuroprotectores durante la fase de epileptogénesis (Löscher, et al., 1998; Willmore, 2005; Shetty, 2013; Stratton, et al., 2003). En un modelo de traumatismo craneoencefálico, se ha observado que una sola dosis de LEV reduce la degeneración neuronal en el hipocampo después de la lesión, además de mejorar las funciones motoras (Wang, et al., 2006). La eficacia de LEV como fármaco neuroprotector contra

las lesiones cerebrales traumáticas ha recibido mucha consideración. Los estudios en animales validan una mayor preservación de las neuronas de la FH con la administración de dicho fármaco (Shetty, 2013).

En un modelo de isquemia cerebral focal en ratas, se ha demostrado que el LEV presenta una neuroprotección significativa, ya que reduce el nivel de daño neuronal. Este efecto se correlacionó, con dosis comparables, tanto a las que inducen efectos antiepiléptogénicos en el kindling en ratas, como a las que inducen efectos anticonvulsivos en pacientes con epilepsia. (Hanon & Klitgaard, 2001; Willmore, 2005). En los modelos de isquemia, donde también se desarrollan crisis epilépticas debido al daño, se ha demostrado el efecto neuroprotector del LEV a largo plazo, al mismo tiempo que se controlan las crisis. Por lo que este efecto se atribuyó a la modificación de los mecanismos epileptogénicos intrínsecos, así como en los modelos de kindling eléctrico, al mostrar que en ambos casos el daño neuronal es similar (Hanon & Klitgaard, 2001; Belcastro, et al., 2011). La isquemia hipóxica causa daño neuronal y muerte de células neuronales principalmente por necrosis, aunque se ha observado que la apoptosis también juega un papel importante en la evolución de la lesión hipóxica isquémica en el cerebro. En un modelo de isquemia hipóxica neonatal se observó que las células apoptóticas, en el hipocampo y la corteza, disminuyeron significativamente en comparación con aquellos animales que no recibieron el tratamiento. Incluso, en el tratamiento con LEV, los recuentos de células apoptóticas fueron similares a los del grupo control, es decir, sin isquemia (Kilicdag, et al., 2013). En un estudio reciente, de un modelo de isquemia cerebral en ratas, se encontró que el tratamiento con LEV previno significativamente la muerte de las células neuronales, promovió la angiogénesis y la recuperación funcional del sistema nervioso. Estos efectos se atribuyen a la capacidad neuroprotectora del fármaco por diversos mecanismos, incluida acción antiinflamatoria, el aumento de la expresión de VEGF, HIF-1 α y HSP70, y la reducción de la apoptosis neuronal (Yao, et al., 2021).

Cabe mencionar que los efectos neuroprotectores del LEV también se han evaluado en un modelo de diabetes en ratones, donde el fármaco demostró tener efecto en la rinoplastia (complicación neurodegenerativa asociada a la diabetes mellitus). Dado que la retina neural y vascular mantienen la integridad del ojo, incluida la salud y la funcionalidad de la retina, en la diabetes se genera la apoptosis neuronal retiniana y

la activación de las células gliales, generando la rinoplastia. El LEV disminuyó la expresión de los marcadores apoptóticos Tp53 (proteína tumoral 53) e iNOS (sintasa de óxido nítrico inducible), así como de algunos indicadores neuronales de estrés y activación microglial como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP); y además, aumentó la regulación del marcador neuronal de regeneración GAP43 (Mohammad, et al., 2019).

Todos estos estudios demuestran los efectos neuroprotectores del LEV en diferentes situaciones y modelos. Pero su efecto en la fase crónica de la ELT se desconoce, por lo que es necesario seguir investigando. A pesar de que sigue en debate si las CER continúan con el proceso de neurodegeneración, se ha observado que la FH es una de las estructuras más susceptibles a la muerte neuronal, además de la generación de circuitos aberrantes y otras alteraciones en la citoarquitectura de las neuronas (Scorza et al., 2009; Zamudio, et al., 2019). Todos estos cambios podrían contribuir a los déficits cognitivos presentes durante la fase crónica de la epilepsia, e incluso explicar por qué en algunos pacientes las crisis epilépticas se presentan con mayor frecuencia e intensidad (Scorza et al., 2009; Cid, et al., 2021; Grosser, et al., 2020). Para esto es necesario seguir investigando la muerte neuronal en la ELT, incluso en la etapa crónica, y continuar con el desarrollo de tratamientos neuroprotectores, como el LEV, para prevenir las consecuencias a largo plazo en los pacientes (Zamudio, et al., 2019). La neuroprotección puede ser un elemento crítico del alivio de la remodelación continua de los circuitos neuronales en las epilepsias establecidas (Klitgaard & Pitkänen, 2003), por ello el LEV como fármaco neuroprotector es ahora un foco de atención en las investigaciones que podría contribuir a mejorar la calidad de vida de los pacientes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los estudios mencionados anteriormente, han demostrado que el LEV, un FAE de segunda generación efectivo en el control de las crisis, tiene efectos neuroprotectores en la fase aguda y latente de la ELT, así como en otras patologías que presentan una continua muerte neuronal. Actualmente sigue siendo controversial si durante la fase crónica de la ELT continúa el proceso de muerte neuronal. Menos aún se conoce si el LEV puede impedir el progreso de la neurodegeneración, revirtiendo o aminorando

el deterioro cognitivo presente en la epilepsia crónica temprana,. Por lo que se realizarán experimentos para observar y cuantificar la muerte neuronal, al mismo tiempo que se evaluarán los efectos del LEV en la supervivencia neuronal, de la FH de ratas con ELT durante la fase crónica temprana inducida con litio y pilocarpina.

JUSTIFICACIÓN

La epilepsia focal más frecuente es la ELT, que generalmente produce neurodegeneración de la FH, y es la epilepsia farmacorresistente más común ya que aproximadamente el 30% de los pacientes no pueden controlar sus crisis con un tratamiento médico. Debido a que la ELT es una enfermedad de alta incidencia, se han desarrollado diversos FAEs con el objetivo de controlar las crisis, así como disminuir las comorbilidades. El LEV tiene efectos sobre la hiperexcitabilidad neuronal, además se destaca por su novedoso y principal mecanismo de acción a través de la interacción con la proteína SV2A. Asimismo, se ha observado que el LEV puede tener efectos neuroprotectores en la etapa aguda y de epileptogénesis de la ELT, así como en modelos de isquemia, traumatismo craneoencefálico y diabetes. No obstante, se conoce poco de los efectos neuroprotectores del LEV durante la ELT crónica, por lo que estudiar esto podría ayudar a comprender mejor los beneficios de su implementación, y mejorar la calidad de vida de los individuos que padecen esta enfermedad.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

- Evaluar el efecto neuroprotector del LEV, en la FH de ratas con ELT inducida con litio y pilocarpina, durante la epilepsia crónica.

2. Objetivos particulares

- Observar si en la fase crónica de la ELT continúa la muerte neuronal en la FH, utilizando la tinción de FJB para cuantificar las células en proceso de neurodegeneración y la inmunoreactividad a la proteína nuclear específica de neurona (NeuN) para la supervivencia neuronal.

- Evaluar el efecto de la administración de LEV en el proceso de neurodegeneración y sobrevivencia neuronal en la fase crónica de la ELT.

HIPÓTESIS

En ratas con ELT inducida con litio y pilocarpina, continúa el proceso de neurodegeneración durante la fase crónica.

El LEV funciona como un fármaco neuroprotector al disminuir la muerte neuronal en la FH, y por lo tanto incrementar la sobrevivencia de las células neuronales.

UBICACIÓN DEL ESTUDIO

Este proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de Neurociencias, en el laboratorio de Farmacología, en el Bioterio y en la Unidad de Equipos para Investigación Translacional en Modelos Animales (UEITMA) del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 4 grupos de ratas: control (CTRL), control tratado con LEV (CTRL+LEV), epiléptico (EPI) y epiléptico tratado con LEV (EPI+LEV). En el día 1 se les indujo el EE, a los grupos EPI y EPI+LEV. En la semana 6, posterior a la inducción del EE, comenzó la videograbación para el registro de las CER, esto durante 2 semanas. Las ratas que presentaron al menos dos CER por semana, durante una semana, se incluyeron en los grupos EPI o EPI+LEV. En la semana 7, a las ratas de los grupos CTRL+LEV y EPI+LEV se le implantó una minibomba osmótica para la administración del fármaco de manera continua, durante siete días. En la semana 8, a los animales tratados con LEV, se les removió la bomba. Ese mismo día, las ratas fueron sacrificadas y perfundidas por vía intracardiaca con solución salina y paraformaldehído, y posteriormente se extrajo el cerebro que se cortó en secciones para poder realizar la tinción con FJB y la inmunohistoquímica para el marcador neuronal NeuN. El diagrama de flujo y la línea del tiempo del diseño experimental se muestran en la figura 4 y 5, respectivamente.

1. Diagrama de flujo

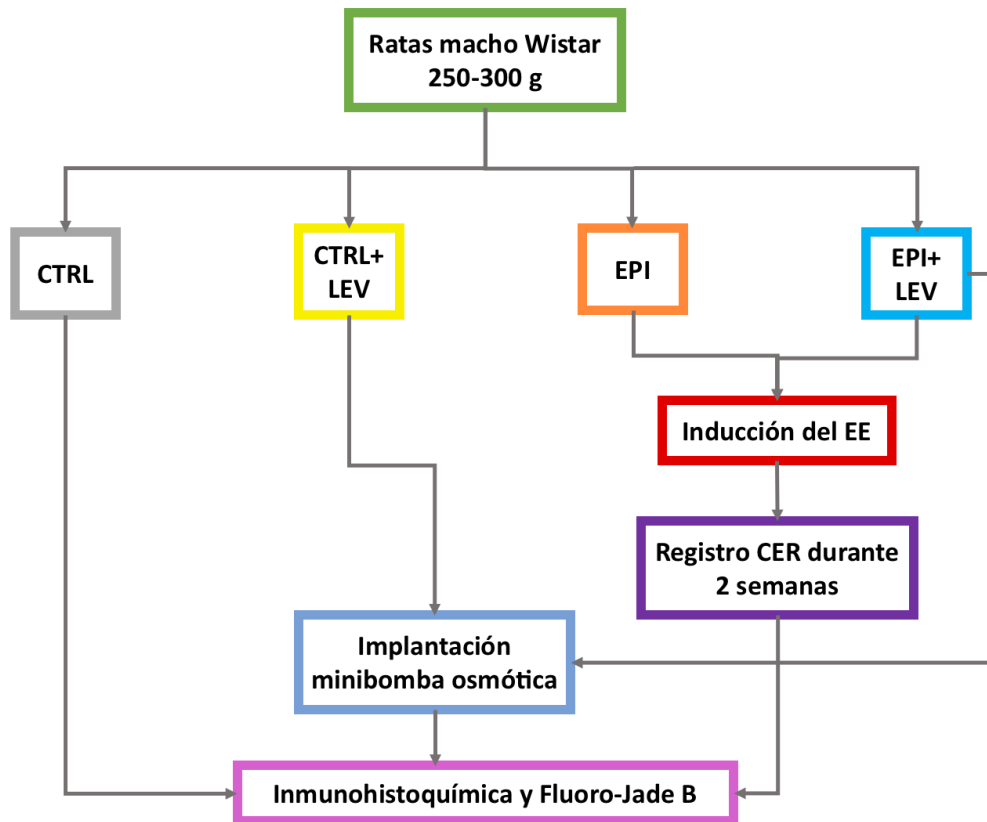


Figura 4. Diagrama de flujo del diseño experimental. Se utilizaron ratas macho Wistar con peso de entre 250-300 g al inicio del experimento. Las ratas se dividieron en 4 grupos: control (CTRL), control con tratamiento (CTRL+LEV), epilépticas (EPI), y epilépticas con tratamiento (EPI+LEV). A los grupos epilépticos se les indujo el EE. Posteriormente se registraron las CER durante dos semanas, periodo durante el cual comenzó el tratamiento con LEV en los grupos correspondientes (CTRL+LEV y EPI+LEV). Terminando dicho periodo, los animales de los cuatro grupos fueron sacrificados para realizar la inmunohistoquímica y la tinción con Fluoro-Jade B.

2. Línea del tiempo



Figura 5. Línea del tiempo del diseño experimental. Al día 1, a los animales de los grupos epilépticos se les indujo el EE. Posteriormente, se les proporcionaron cuidados especiales durante 3 días. En la semana 6 se inició la videograbación para el registro de las CER, lo que duró 2 semanas (hasta la semana 8). En la semana 7, a los grupos con tratamiento se les implantó las minibombas osmóticas. Por último, en la semana 8, las bombas fueron retiradas. Asimismo, el tejido de todos los grupos se obtuvo para los análisis correspondientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Población

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 250-300 g de peso corporal, adquiridas del Instituto Politécnico Nacional. Los animales se alojaron en el bioterio, y fueron colocados en cajas de policarbonato con una cama de viruta en un cuarto con temperatura de 20 ± 2 °C, 50% de humedad relativa, ciclos de 12 horas de luz/oscuridad (encendido de la luz 7:00 a.m.) y consumo de alimento y agua *ad libitum*. Una vez inducido el EE, las ratas de los grupos EPI y EPI+LEV se pusieron en cajas individuales, las del grupo CTRL+LEV, en un inicio, se alojaron 5 ratas por caja y después de la implantación de las bombas se colocaron en cajas individuales, mientras que las ratas del grupo CTRL se alojaron en un grupo de 5 ratas por caja durante todo el proyecto. Los animales de experimentación fueron manejados conforme a la norma oficial mexicana de la secretaría de agricultura (SAGARPA NOM-062-Z00-1999) publicada en 2001: “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” y se siguieron los lineamientos internos del Reglamento del Bioterio del INP.

2. Inducción del EE

El modelo de este proyecto se encuentra basado en la inducción de una lesión inicial, a través de la generación del EE, mediante la administración de litio y pilocarpina. La actividad convulsiva intermitente o continua, que ocurre sin interrupción por más de 5 minutos sin recuperación, va a definir al EE. Todos los grupos fueron tratados con cloruro de litio (127 mg/kg vía i.p.; Sigma-Aldrich, #L9650), entre 19 y 24 horas antes de la administración de pilocarpina a los grupos epilépticos. El día que se indujo el EE (día 1) se les administró bromuro de metiloscopolamina (1 mg/kg; vía i.p.; Sigma-Aldrich, #S8502) a los grupos EPI y EPI+LEV, 30 minutos antes de recibir una dosis de pilocarpina (60 mg/kg; vía i.p.; Sigma-Aldrich, #P6503), esto para contrarrestar los efectos colinérgicos periféricos. Una vez administrada la pilocarpina, en aquellas ratas donde el EE no se presentó en los primeros 60 minutos, se empleó una segunda dosis de pilocarpina, y todas las ratas que no llegaron al EE con la segunda dosis fueron excluidas del estudio. Se observó y clasificó la conducta epiléptica con la escala de Racine (tabla 1); cuando la rata alcanzó la puntuación de 3 a 5, más de dos veces consecutivas, o permaneció con una crisis durante dos minutos, se estableció la hora

de inicio del EE, y posteriormente se detuvo a los 90 minutos con DZP (5 mg/kg; vía i.m.; PISA, 070M95). Se administró una segunda dosis de DZP 8 horas después.

Posterior a la primera dosis de DZP los animales se colocaron en una cama de hielo, durante una hora, y pasaron la noche en un cuarto con temperatura de 17 ± 2 °C para disminuir la hipertermia generada durante y después del EE. Durante los siguientes 3 días se les dieron cuidados especiales a las ratas de los grupos EPI y EPI+LEV. Aquellas que presentaron un continuo deterioro en su estado general de salud, alguna enfermedad (ej. infecciones) o muerte durante el desarrollo del proyecto, fueron eliminadas.

Tabla 1. *Escala de Racine.*

Estado	Conducta
0	Inmovilidad, piloerección, excitación e hiperventilación.
1	Movimiento de hocico y lengua, vibrisas, salivación y escalofríos.
2	Movimientos de cabeza, rigidez en la cola.
3	Clonus de extremidades anteriores, masticación y sacudidas.
4	Crisis tónico-clónicas.
5	Crisis tónico-clónicas con pérdida de postura y saltos descontrolados.

Nota. Adaptado de “Modification of seizure activity by electrical stimulation: I. after-discharge threshold”, por Racine, 1972.

3. Registro de las crisis espontáneas y recurrentes

A través de la videograbación conductual de las ratas se realizó el registro del número y duración de las CER. En la semana seis, posterior a la inducción del EE, los animales fueron alojados en un estante del bioterio, de forma individual, con un máximo de 6 ratas, por cámara, al mismo tiempo para realizar el video-monitoreo. Los videos fueron analizados a una velocidad de 8x con el software Windows PowerDVD 15, y cuando la actividad de las CER se observó, el video se regresó, analizado desde el inicio la conducta en tiempo real. Al alcanzar una puntuación conductual de 3 o más, de acuerdo con la escala de Racine (tabla 1), se consideró como una CER. Los

registros fueron de 2 semanas, durante las 24 horas, incluyendo la semana del tratamiento con LEV.

4. Tratamiento con LEV

El LEV fue administrado a través de minibombas osmóticas (Alzet®), manteniendo una liberación continua de LEV (300 mg/kg/día) durante la semana del tratamiento. Para el llenado de las minibombas, el LEV se extrajo a partir de tabletas de la marca Pharmalife de 500mg. Se disolvieron dos tabletas en 3 mL de solución salina isotónica (SSI), la mezcla que fue sonicada durante 15 minutos, y centrifugada a 3000 rpm por otros 15 minutos (1400 × g, Hermle Labnet 2326K, rotor 220.72), posteriormente, el sobrenadante se decantó y filtró con la finalidad de rellenar las bombas, esto de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las bombas se incubaron por al menos 4 horas a 37°C en SSI, para asegurar la liberación inmediata de su contenido una vez implantadas. El reservorio promedio de este tipo de bombas es de 2 mL, la capacidad de bombeo es de 10 µL/h por una semana.

5. Implantación minibombas osmóticas

En la séptima semana las minibombas osmóticas, llenas con LEV, se implantaron de manera subcutánea. Para ello las ratas se anestesiaron con isoflurano al 5% (con flujo de O₂ de 2 mL/min) durante la inducción y del 2-3% para el mantenimiento. Posterior a que se confirmó el estado anestésico (ausencia del reflejo flexor), se realizó una pequeña incisión en la espalda de las ratas, a la altura de la escápula izquierda, con unas tijeras se cortó el tejido conectivo entre la piel y el músculo para crear una bolsa bajo la piel, donde se colocó la minibomba cuidando que el moderador de flujo se encontrara apuntando lejos de la incisión, es decir, hacia la parte caudal. Se suturó y limpió la incisión con solución antiséptica, y después se administró una dosis de enrofloxacin (5 mg/kg, vía i.m.), así como una inyección aguda de LEV (200 mg/kg, vía i.p.; solución inyectable Keppra). Finalmente, las bombas se removieron durante el efecto anestésico de la rata, antes de la obtención del tejido para la inmunohistoquímica y FJB.

6. Obtención del tejido

Los animales se anestesiaron por vía i.p. con pentobarbital (150 mg/kg), para ser perfundidos, vía intracardiaca, con solución salina (NaCl 0.9%) seguida de paraformaldehído (4%, diluido en amortiguador de fosfatos [PB] 0.1M; pH 7.4). Posteriormente se decapitaron con una guillotina afilada y los cerebros fueron disecados y post fijados en paraformaldehído a temperatura ambiente durante 24 horas. Cumplido el tiempo, los cerebros se transfirieron a una solución de sacarosa (20% y 30%) hasta que se infiltraron completamente. Los cerebros se congelaron y almacenaron hasta su uso a una temperatura de -80°C. Se realizaron cortes sagitales seriados, con un grosor de 50µm, con un criostato. Por último, las muestras se almacenaron en solución crioprotectora hasta el momento de realizar las tinciones correspondientes.

7. Inmunohistoquímica

Para detectar el número de neuronas presentes en la FH se realizó la inmunohistoquímica para NeuN. Los tejidos se lavaron 3 veces con amortiguador de fosfatos con tritón (PBT; 0.1M; pH 7.4; tritón X-100, 0.3%), durante 10 minutos cada uno. Al término del lavado se dejaron durante 10 minutos con peróxido de hidrógeno al 3%, para inactivar la peroxidasa endógena. Nuevamente se realizaron 3 lavados con PBT durante 10 minutos cada uno. Posteriormente, el tejido se incubó con solución de bloqueo, preparada con suero fetal bovino (SFB) al 5%, por una hora. Concluido el tiempo, se incubó con el anticuerpo primario NeuN (Rbt policlonal, Abcam, ab104225), en una dilución de 1:500 con solución de bloqueo. Al día siguiente, el tejido se lavó 3 veces con PBT durante 15 minutos, para después agregar el anticuerpo secundario Anti-rabbit Goat (Vector biotinilado, BA1000) en una dilución 1:500 con solución de bloqueo, e incubar durante dos horas. Se realizaron 3 lavados con PB de 10 minutos, transcurridas las dos horas, para posteriormente incubar con Avidina-Biotina (Vector, #PK6100) durante una hora. Por último los tejidos se revelaron con 3,3'-diaminobencidina (DAB; Vector laboratories, SK-4100) durante 3 minutos y se montaron en portaobjetos gelatinizados.

Nota: En el anexo 1 se detalla la preparación de las soluciones necesarias para la inmunohistoquímica.

8. Tinción con Fluoro-Jade B

Para la tinción con FJB, se lavaron los cortes histológicos 3 veces con PB durante 10 minutos, se montaron en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar durante un día. Posteriormente se inició la tinción de FJB, donde las laminillas se procesaron por separado, es decir, se trabajó con cada grupo (EPI, EPI+LEV, CTRL, CTRL+LEV) de manera individual para evitar mezclar los tejidos. Las laminillas se transfirieron a una solución de alcohol básico durante 5 minutos, después se colocaron 2 minutos en alcohol al 70% y 2 minutos en agua destilada. Al término, se sumergieron las laminillas en permanganato de potasio al 0.06% durante 10 minutos, y se lavaron con agua destilada por 2 minutos antes de ser transferidas a la solución de FJB (Biosensis, TR-150-FJB) al 0.0004% donde permanecieron 120 minutos. Pasadas las 2 horas se realizaron 3 lavados con agua desilada de 1 minuto cada uno, para, por último, dejar secar perfectamente los tejidos y colocar el cubreobjetos utilizando resina.

Nota: En el anexo 2 se especifica la manera en la que se prepararon las soluciones necesarias durante el procedimiento.

9. Cuantificación celular

Las imágenes de los tejidos se obtuvieron con un aumento de 10X. La cuantificación para la inmunohistoquímica con NeuN se realizó con el programa ImageJ, midiendo la densidad óptica de las capas CA1 y CA3 del hipocampo, además de la granular e Hilus del GD. En cambio, para la cuantificación de las células positivas a FJB, se contaron manualmente en las capas CA1, CA3 e Hilus de la FH.

Nota: En el anexo 3 se especifica como utilizar el programa ImageJ para la cuantificación de la densidad óptica relativa.

10. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se realizó la prueba de ANOVA de una vía, considerando $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativo. Para la comparación entre los distintos grupos, posterior al ANOVA, se utilizó la prueba post hoc de Tukey-Kramer. Las gráficas realizadas se realizaron tomando en cuenta la media y el error estandar (std) de cada grupo.

RESULTADOS

1. Tinción con Fluoro-Jade B (FJB)

En la capa CA1, se observan células FJB+, indicando neurodegeneración dentro del grupo EPI (figura 6, panel C); en la imagen se puede apreciar una línea vertical de células fluorescentes positivas a FJB (flecha naranja). El tratamiento con levetiracetam redujo considerablemente la cantidad de células FJB+ (figura 5, panel D), donde se aprecia de manera tenue el marcaje (flecha azul). Por el otro lado, en los grupos CTRL y CTRL + LEV no hay marcaje, es decir, no se encontraron células en neurodegeneración FJB+ (figura 6, panel A y B).

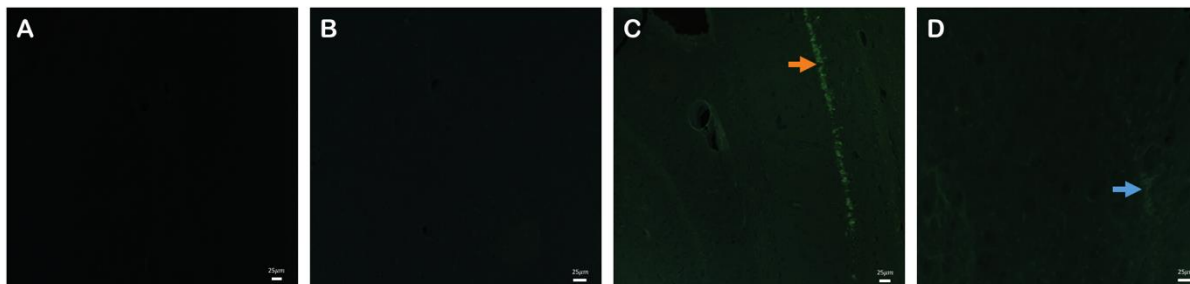


Figura 6. Tinción de Fluoro-Jade B de CA1, en cortes sagitales de la formación hipocámpica de rata. Las células en neurodegeneración, positivas para FJB, se denotan de color verde fluorescente. A) Grupo control (CTRL). B) Grupo control tratado con levetiracetam (CTRL+LEV). C) Grupo epiléptico (EPI); la figura muestra diversas células marcadas con FJB (flecha naranja). D) Grupo epiléptico tratado con levetiracetam (EPI+LEV); se observa un marcaje muy tenue (flecha azul).

La diferencia observada en la capa CA1 del grupo EPI con respecto al resto, es estadísticamente suficiente para establecer que existe una diferencia significativa (figura 7; en la gráfica se puede apreciar cuantitativamente el incremento en las células positivas para FJB de las ratas epilépticas (182.5 ± 64.2297). Asimismo se observa que en el grupo EPI + LEV se reduce la cantidad de células en neurodegeneración FJB+ (32.0535 ± 57.8508), estableciendo la existencia de una diferencia significativa con respecto al grupo EPI. A pesar de que en las ratas epilépticas con tratamiento se siguen observando células fluorescentes FJB+, la cantidad no es suficiente para establecer que existe una diferencia en comparación con los grupos CTRL (0.15 ± 0.1914) y CTRL + LEV (0.0833 ± 0.1666) en donde no se observaron células FJB+.

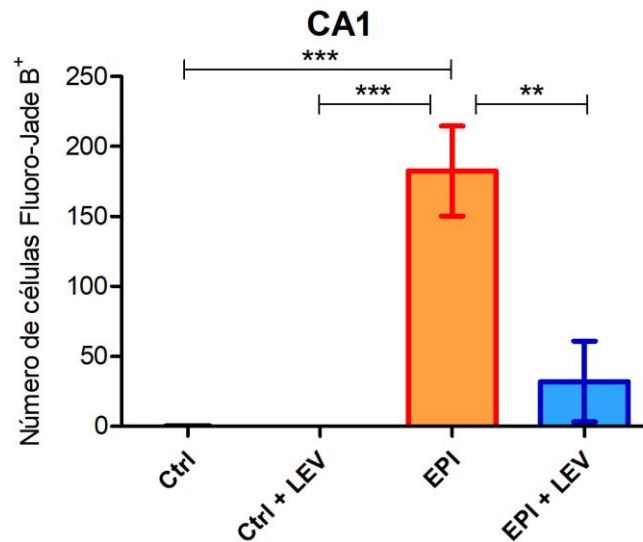


Figura 7. Cuantificación de las células FJB⁺ de la capa CA1 de la formación hipocámpica de ratas, para los grupos control (Ctrl), control tratamiento (Ctrl + LEV), epiléptico (EPI) y epiléptico con tratamiento (EPI + LEV). Media \pm std. ANOVA de una vía, seguida de la prueba *post hoc* de Tukey-Kramer. *** $p \leq 0.001$ y ** $p \leq 0.01$.

Cualitativamente, en el Hilus del GD, se ven células positivas para FJB en el grupo EPI (figura 8, panel C). En cambio para el resto de los grupos no hay células en neurodegeneración FJB+, incluso en el grupo EPI + LEV (figura 8, panel A, B y D). A pesar de que se encontraron células positivas para FJB en el Hilus del grupo EPI (18.2738 ± 23.4252), este incremento no es suficiente para determinar que existe una diferencia estadística con respecto al grupo CTRL (0), CTRL + LEV (0.0833 ± 0.1666) y EPI + LEV (0.3214 ± 0.6428), es decir, no hay variación entre los grupos (figura 9).

Lo mismo sucede para la capa CA3 del hipocampo, donde a pesar de que se observan células FJB+ en el grupo EPI (figura 8, panel G) y en el resto de los grupos no (figura 8, panel E, F y H), cuantitativamente no existe una diferencia significativa (figura 9) entre EPI (5.7916 ± 7.6271), EPI + LEV (0.2261 ± 0.2786), CTRL (0) y CTRL + LEV (0).

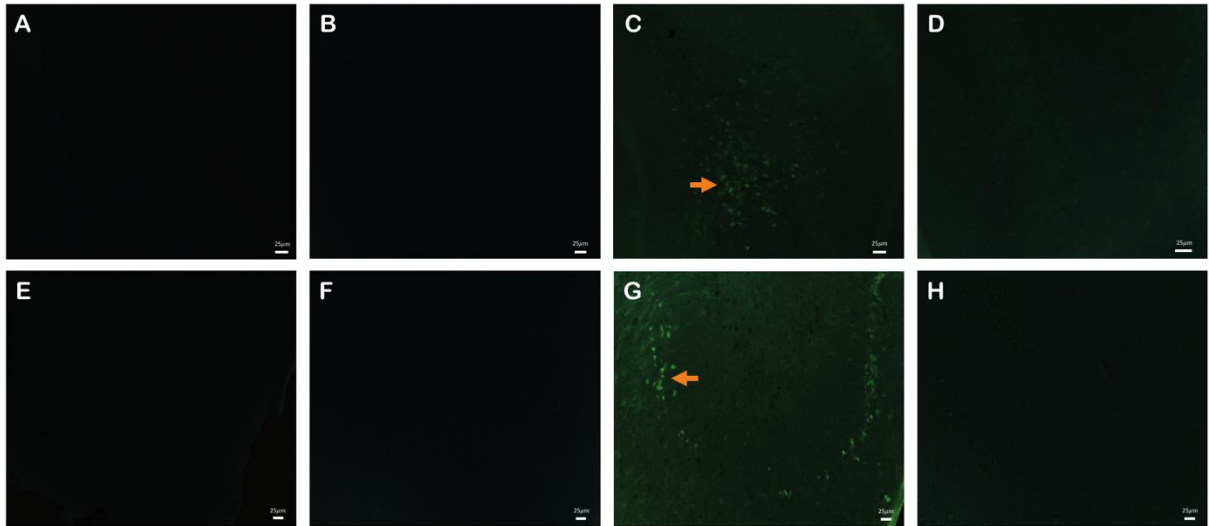


Figura 8. Tinción de Fluoro-Jade B del Hilus y CA3, en cortes sagitales de la formación hipocámpica de ratas. Las células en neurodegeneración, positivas para FJB, se denotan de color verde fluorescente. Las imágenes A, B, C y D corresponden al Hilus: A) Grupo control, B) Grupo control tratado con levetiracetam, C) Grupo epiléptico; se muestra diversas células marcadas con FJB (flecha naranja), y D) Grupo epiléptico tratado con levetiracetam. Las imágenes E, F, G y H son de la capa CA3: E) Grupo control, F) Grupo control tratado con levetiracetam, G) Grupo epiléptico; con la flecha naranja se señalan células positivas para FJB, y H) Grupo epiléptico tratado con levetiracetam.

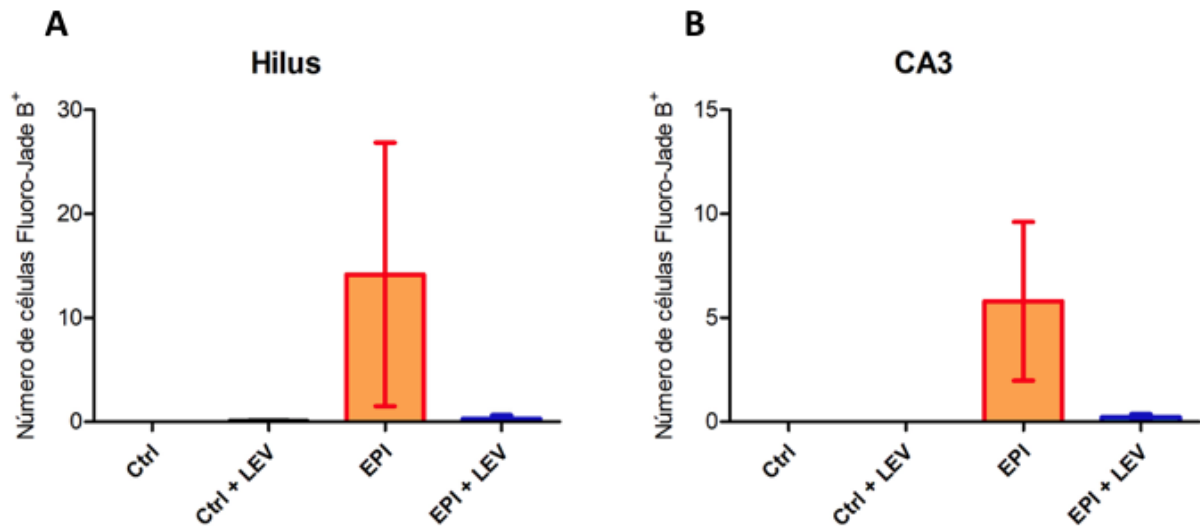


Figura 9. Cuantificación de las células FJB+ del Hilus y CA3 de la formación hipocámpica de ratas, para los grupos control (Ctrl), control tratamiento (Ctrl + LEV), epiléptico (EPI) y epiléptico con tratamiento (EPI + LEV). A) Hilus y B) CA3. Media \pm std. ANOVA de una vía, seguida de la prueba post hoc de Tukey-Kramer.

2. Inmunohistoquímica para NeuN

En las inmunohistoquímicas para determinar marcaje con NeuN, de manera cualitativa, se observan diferencias en la cantidad de células presentes entre los grupos, para la mayoría de las capas analizadas. En la capa CA1, las ratas del grupo

EPI muestran una reducción en las células piramidales (figura 10, panel C) en comparación con el resto de los grupos, incluso con el EPI + LEV donde no se observa alguna diferencia con respecto al CTRL y CTRL + LEV (figura 10, panel A, B y D); en la capa CA1 del grupo EPI, el marcaje NeuN+ no se observa de manera clara y bien delimitada (núcleos teñidos en color negro) como en el resto de los grupos.

De igual manera, en la capa CA3 del hipocampo (figura 11) y en el Hilus del GD (figura 13), cualitativamente, se observa una reducción en las células NeuN+ del grupo EPI. En cambio, en el resto de los grupos (EPI + LEV, CTRL y CTRL + LEV), esta reducción no se observa y entre ellos no se puede apreciar alguna diferencia.

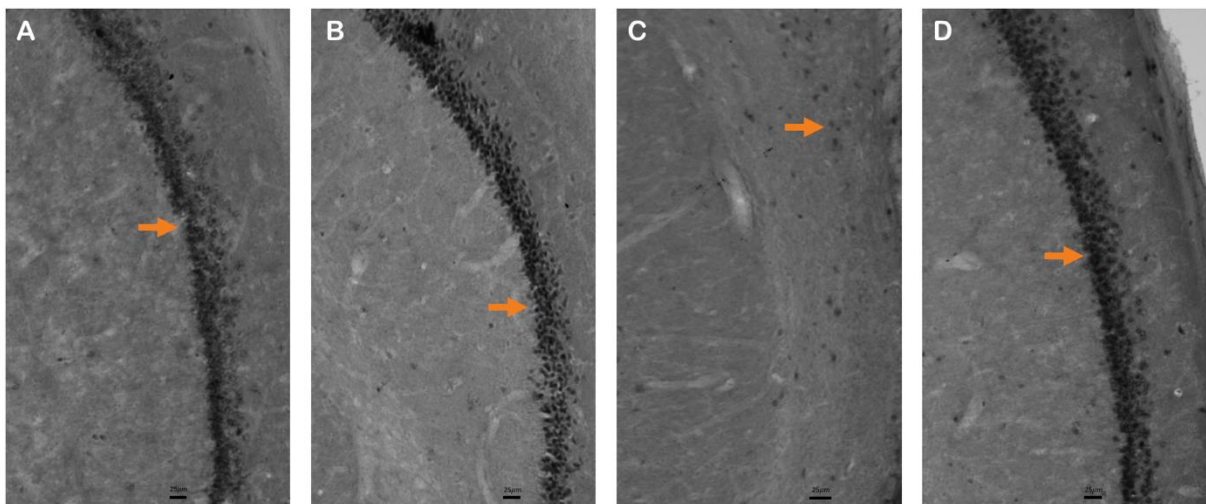


Figura 10. Inmunohistoquímica de NeuN de la capa CA1, en cortes sagitales de la formación hipocámpica de ratas. Células inmunopositivas a NeuN se observan de color morado oscuro. A) Grupo control. B) Grupo control tratado con levetiracetam. C) Grupo epiléptico. D) Grupo epiléptico tratado con levetiracetam. Flechas naranjas señalan la capa CA1 del hipocampo.

A pesar de la disminución de células NeuN+ observada de manera cualitativa en las capas analizadas (CA1, CA3 e Hilus) del grupo EPI, de manera cuantitativa no hay una diferencia significativa en comparación con el resto de los grupos. La densidad óptica relativa medida, para cada grupo en las distintas capas, no indica la existencia de esta diferencia (figura 12).

Aunque en las gráficas también se puede apreciar que la densidad óptica relativa del grupo EPI es menor en CA1 (figura 12, panel A), CA3 (figura 12, panel B) e Hilus (figura 12, panel C), esto no es suficiente para establecer que existe una diferencia estadística. Tanto en CA1 los grupos CTRL (0.23 ± 0.1202), CTRL + LEV (0.2325 ± 0.1424), EPI (0.0657 ± 0.0189) y EPI + LEV (0.1525 ± 0.1037), como en CA3 los

grupos CTRL (0.1725 ± 0.0881), CTRL + LEV (0.1725 ± 0.0928), EPI (0.095 ± 0.0331) y EPI + LEV (0.15 ± 0.0808), y en el Hilus los grupos CTRL (0.0475 ± 0.0206), CTRL + LEV (0.0425 ± 0.015), EPI (0.0325 ± 0.005) y EPI + LEV (0.0425 ± 0.0125), presentaron una densidad óptica relativa similar.

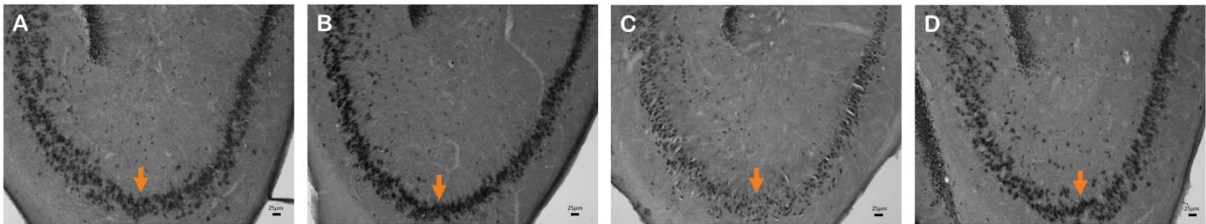


Figura 11. Inmunohistoquímica de NeuN de CA3, en cortes sagitales de la formación hipocámpica de ratas. Células inmunopositivas a NeuN se observan de color morado oscuro. A) Grupo control, B) Grupo control tratado con levetiracetam, C) Grupo epiléptico y D) Grupo epiléptico tratado con levetiracetam. Flechas naranjas señalan la capa CA3 del hipocampo.

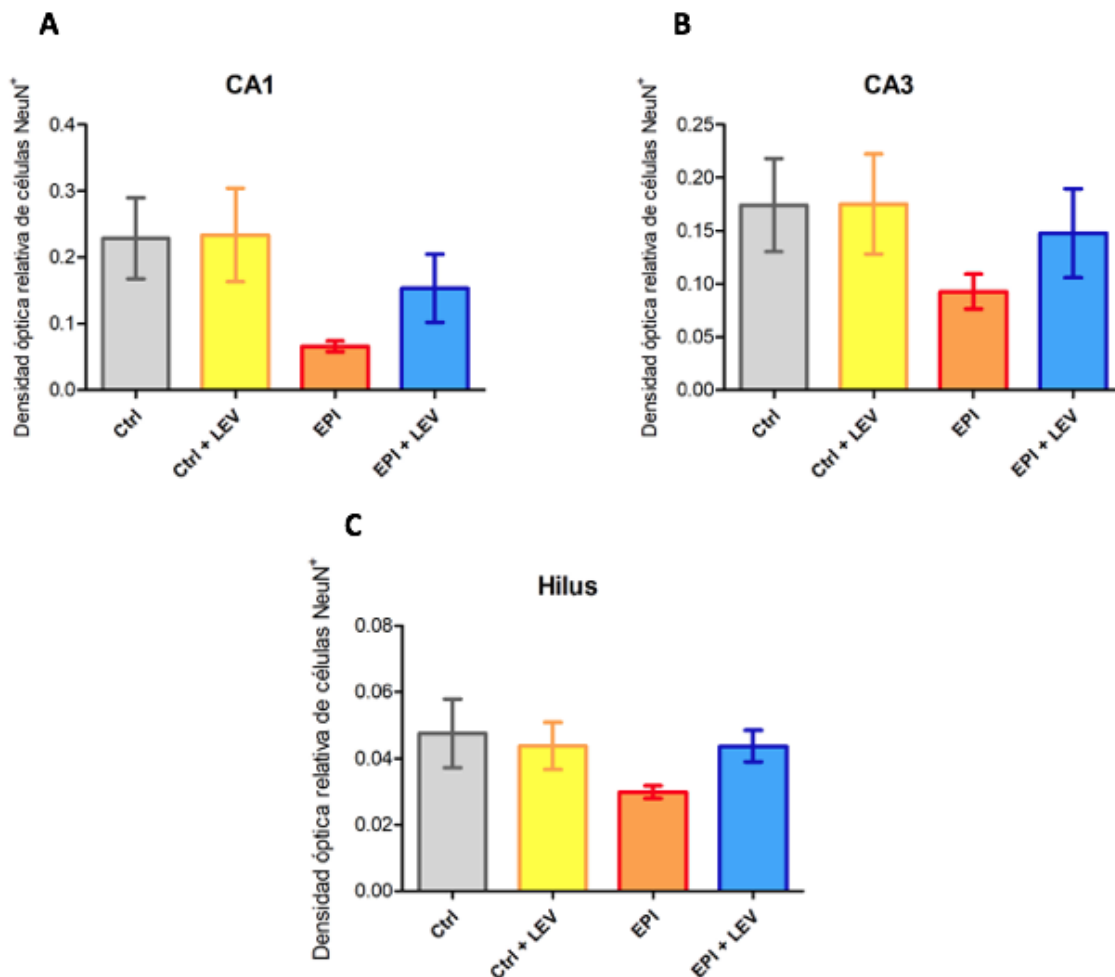


Figura 12. Cuantificación de la densidad óptica relativa de células NeuN positivas en CA1, CA3 e Hilus de la formación hipocámpica de ratas, para los grupos control (Ctrl), control tratamiento (Ctrl + LEV), epiléptico (EPI) y epiléptico con tratamiento (EPI + LEV). Se muestra el número de células positivas a NeuN. A) CA1, B) CA3 y C) Hilus. Media \pm std ANOVA de una vía, seguida de la prueba *post hoc* de Tukey-Kramer.

A diferencia de CA1, CA3 e Hilus, en la capa granular del GD no se observan cualitativamente diferencias entre los grupos; en todos se aprecia de manera clara y bien delimitada la capa, incluso en el grupo EPI (figura 13). Esto coincide con el análisis cuantitativo, donde la densidad óptica relativa de la capa granular en el grupo EPI (0.175 ± 0.0613) es similar a la medida en los grupos CTRL (0.22 ± 0.0983), CTRL + LEV (0.23 ± 0.1383) y EPI + LEV (0.2025 ± 0.0994) (figura 14).

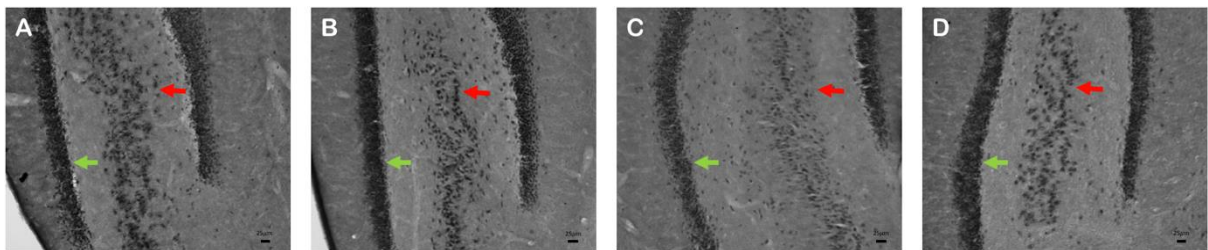


Figura 13. Inmunohistoquímica de NeuN de la capa granular e Hilus, en cortes sagitales de la formación hipocámpica de ratas. Células inmunopositivas a NeuN se observan de color morado oscuro. A) Grupo control, B) Grupo control tratado con levetiracetam, C) Grupo epiléptico y D) Grupo epiléptico tratado con levetiracetam. Flechas rojas señalan el Hilus del GD. Flechas verdes señalan la capa granular del GD.

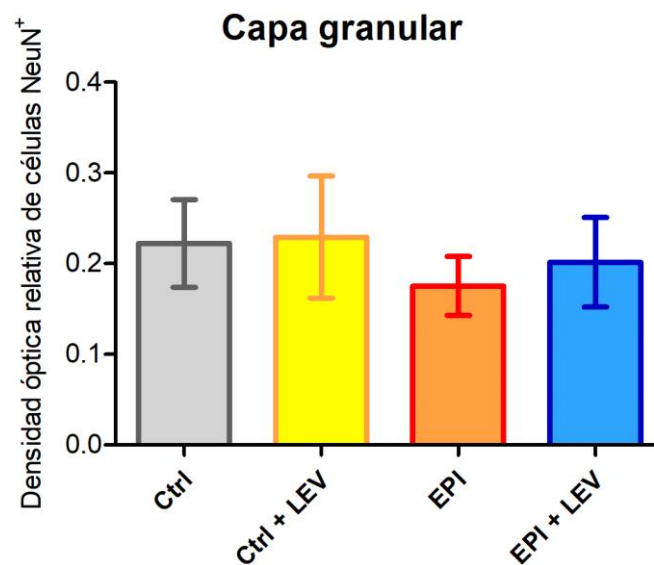


Figura 14. Cuantificación de la densidad óptica relativa de células NeuN positivas en la capa granular de la formación hipocámpica de ratas, para los grupos control (Ctrl), control tratamiento (Ctrl + LEV), epiléptico (EPI) y epiléptico con tratamiento (EPI + LEV). Se muestra el número de células positivas a NeuN. Media \pm std. ANOVA de una vía, seguida de la prueba *post hoc* de Tukey-Kramer.

DISCUSIÓN

En la ELT la anormalidad histopatológica más común es la esclerosis temporal mesial, en donde hay atrofia de la FH con muerte neuronal y proliferación de células gliales (Curia, et al., 2008). Existen diversos tipos de esclerosis hipocampal (tipo 1, 2 y 3), la clasificación depende de la zona de la FH que se encuentra mayormente afectada (Blümcke et al., 2013). De manera general, las capas CA1 y CA3 del hipocampo, y el Hilus del GD son regiones con neuronas susceptibles a la neurodegeneración, por lo que dichas zonas suelen ser las más afectadas, presentando amplia muerte neuronal y gliosis reactiva (Blümcke et al., 2013; Pereno, 2010). En el presente trabajo, en el grupo EPI, se observaron células FJB+ principalmente en CA1, aunque también en CA3 e Hilus de la FH, lo que indica que durante la fase crónica de la ELT continúa el proceso de neurodegeneración en dichas capas, contribuyendo a la atrofia de la estructura. A pesar de que se observaron células FJB+ en la capa CA3 del hipocampo e Hilus del GD, únicamente en CA1 la cantidad de células en neurodegeneración fue suficiente para marcar una diferencia estadísticamente significativa con respecto al resto de los grupos. Esto se relacionó con una disminución cualitativa de células NeuN en CA1, CA3 e Hilus, aunque cuantitativamente no se encontraron diferencias. Asimismo, el tratamiento con LEV, disminuyó la neurodegeneración e incrementó, cualitativamente, la supervivencia neuronal en CA1, CA3 e Hilus.

Wang y colaboradores (2008), utilizaron Fluoro-Jade C (FJC: un marcador fluorescente, similar al Fluoro-Jade B) para evaluar la progresión de la muerte neuronal en el modelo de ELT inducida con pilocarpina. Los autores encontraron células en neurodegeneración de 4 horas a 14 días después del EE en diversas áreas del cerebro incluyendo CA1, CA3 e Hilus de la FH. Aunque la cantidad de células FJC+ disminuyó a los 14 días, todavía se encontraron células en neurodegeneración durante la fase crónica de la ELT (Wang, et al., 2008). Esto coincide con los resultados reportados en este trabajo a 56 días después del EE, donde se encontró que durante la fase crónica de la ELT continúa la muerte neuronal en la FH. Asimismo, observaron que la mayoría de las neuronas degenerativas presentaban marcadores apoptóticos (Wang, et al., 2008), indicando que esta vía de muerte celular tiene gran relevancia durante el proceso de neurodegeneración.

Por otra parte, el glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central (SNC), pero también es una potente neurotoxina que puede conducir a la muerte de las células nerviosas (Struzyńska, 2009). El incremento en la excitabilidad neuronal durante la epilepsia, ocasiona la acumulación excesiva de glutamato extracelular y la sobreestimulación de los receptores glutamatérgicos (Pereno, 2010; Struzyńska, 2009). Al ser activados los receptores glutamatérgicos, especialmente NMDA, se produce la entrada masiva de Ca^{2+} a las neuronas, lo que desencadena una cascada de eventos como el aumento en la producción de especies reactivas y excitotóxicas de oxígeno/nitrógeno, activación de proteasas, lipasas, sintasas de óxido nítrico y endonucleasas, todo esto conduce a la muerte neuronal (Scorza, et al., 2009; Struzyńska, 2009). Este proceso excitotóxico podría estar contribuyendo a la muerte neuronal observada en la epilepsia. Además de la hiperexcitabilidad, el estrés oxidativo y la neuroinflamación favorecen la pérdida neuronal y la presencia de gliosis reactiva.

En este mismo sentido, las neuronas son especialmente susceptibles al estrés oxidativo debido a que contienen un gran número de mitocondrias y presentan una alta actividad metabólica, además tienen una amplia superficie de membrana celular que puede ser oxidada; la disfunción mitocondrial y la oxidación de las membranas desencadena el proceso de muerte celular (Pardo-Peña, et al., 2022). Además, las crisis epilépticas favorecen la producción de radicales libres con el subsiguiente daño oxidativo de las proteínas celulares, los lípidos y el ADN, llevando al sistema hacia el estrés oxidativo y generando procesos apoptóticos y necróticos (Patel, 2004; Pardo-Peña, et al., 2022). La muerte neuronal que se observó en este experimento podría relacionarse con un incremento en las especies reactivas, por lo tanto, sería importante evaluar marcadores de estrés oxidativo para corroborar su participación en la neurodegeneración durante la fase crónica de la ELT.

Por otra parte, la pérdida de células neuronales de la FH se ha asociado con un patrón grave de astrogliosis, definido por una densa malla de células positivas para GFAP intensamente inmunoteñidas (Blümcke et al., 2013). En estudios previos se ha observado que durante la fase crónica de la epilepsia hay un aumento en la cantidad de células astrogliales principalmente en CA1, aunque también en el Hilus y en menor cantidad en CA3. Los astrocitos podrían contribuir al progreso de la neuroinflamación

que se observa en la epilepsia al liberar citocinas proinflamatorias (como IL-1 β e IL-6), induciendo procesos apoptóticos e incrementando la muerte de las neuronas de dichas regiones (Cruz, 2023). Las citocinas proinflamatorias se producen y liberan en el cerebro después de las crisis epilépticas. Estudios experimentales han demostrado que estas moléculas contribuyen a la muerte de las células neuronales (López-Meraz et al., 2016). De igual manera la astrogliosis reactiva está asociada con la falla de la barrera hematoencefálica (BH) y puede desencadenar la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos), así como incremento en la neuroinflamación y muerte neuronal (Itoh, et al., 2016). Por lo tanto, se puede correlacionar la muerte neuronal de la FH con la proliferación de astrocitos en la misma zona, indicando que la astrogliosis está íntimamente relacionada con el proceso de neurodegeneración en la ELT.

Es importante mencionar que el tratamiento con LEV disminuyó la muerte neuronal de manera significativa en la capa CA1, y cualitativamente también redujo la neurodegeneración en CA3 e Hilus. El LEV, al unirse con la proteína SV2A, regula negativamente la transmisión sináptica cuando está exacerbada (Meehan et al., 2011; Pichardo-Macías et al., 2016). Además de la unión con la proteína vesicular SV2A, se ha propuesto que el LEV bloquea canales N y P/Q de Ca²⁺ disminuyendo la liberación de neurotransmisores (Chen, et al., 2018). Durante la ELT hay un desbalance en la neurotransmisión excitatoria (glutamato) e inhibitoria (GABA) a favor de la primera, es decir, incrementa la actividad glutamatérgica. Se ha observado que el efecto del LEV se produce cuando la actividad, y por ende el reciclamiento vesicular, aumenta (Meehan et al., 2011), de este modo el LEV puede disminuir la neurotransmisión excitatoria. Asimismo, se propone que puede incrementar la neurotransmisión de GABA (sistema inhibitorio) al evitar la supresión de los receptores GABA_A por parte del Zn²⁺ (Chen, et al., 2018; Wakita, et al., 2013). Mediante estos mecanismos el LEV podría reducir la hiperexcitabilidad neuronal en las ratas epilépticas, evitando la acumulación de glutamato en la hendidura sináptica, incrementando la inhibición del sistema con GABA, y deteniendo la excitotoxicidad y muerte neuronal.

Además de disminuir la hiperexcitabilidad, se ha demostrado que el LEV tiene efectos antioxidantes, lo que podría relacionarse con su actividad neuroprotectora. Oliveira y colaboradores (2007), observaron que la administración de pilocarpina incrementa la

peroxidación lipídica en el hipocampo, mientras que el LEV, administrado previo a la pilocarpina, contrarrestó este aumento y evitó la pérdida de glutatión (GSH). El GSH es parte del sistema antioxidante el cual se encarga de mantener las especies reactivas en niveles adecuados, por lo tanto el LEV, además de reducir el estrés oxidativo, contribuyó al mantenimiento del sistema antioxidante. De este modo la neuroprotección del LEV pueden estar mediada, en parte, por dichos efectos (Oliveira, et al., 2007). A pesar de que Oliveira y colaboradores (2007) evaluaron el efecto antioxidante durante la fase aguda de la ELT, es necesario determinar si sucede lo mismo durante la fase crónica; es importante evaluar si disminuye el estrés oxidativo después del tratamiento con LEV, actuando como un fármaco antioxidante.

Asimismo, el LEV ha demostrado disminuir la cantidad de astrocitos en la FH de ratas epilépticas durante la fase crónica, sugiriendo que el fármaco revierte la astrogliosis (Cruz 2023), también se ha observado que el tratamiento con LEV reduce los niveles de IL-1 β (Kim et al., 2010) y disminuye las anormalidades en la BH (Itoh, et al., 2016). Estos hallazgos se relacionan con un efecto antiinflamatorio, contribuyendo a la neuroprotección.

La neuroprotección en la fase crónica de la epilepsia es crítica para evitar la pérdida neuronal y aliviar la remodelación continua de los circuitos neuronales (Klitgaard & Pitkänen, 2003). El LEV, un FAE con un mecanismo de acción único, ha mostrado tener efectos neuroprotectores en la fase crónica de la ELT al reducir la muerte neuronal en la capa CA1, CA3 e Hilus de la FH. La investigación de su efecto en la fase crónica se ha vuelto de gran relevancia, y convierte al LEV en un posible medicamento para la prevención del deterioro cognitivo característico de la ELT (Smolensky, et al., 2019).

Además de la muerte neuronal en la FH de ratas con ELT, también se observó una disminución en la supervivencia neuronal principalmente en CA1, aunque también en CA3 e Hilus. A pesar de esto, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la densidad óptica relativa de los diferentes grupos. Esto podría deberse a que el método de cuantificación que utilizamos podría no haber sido el más adecuado; sin embargo, no fue posible cuantificar el número de células NeuN+ utilizando el programa ImageJ porque no detectaba claramente las células

individuales, por lo que se optó por realizar la cuantificación de la densidad óptica relativa, restando los valores de una zona blanco (quitando el fondo) y de este modo minimizar el ruido. Debido a que cualitativamente se apreciaban diferencias en las capas del hipocampo, para obtener un mejor resultado y determinar si la disminución de células NeuN+ es significativa, en un futuro, se deberían contar las células por estereología.

CONCLUSIÓN

En el grupo EPI se encontraron células FJB+ en la capa CA1, CA3 e Hilus de la FH, indicando que continúa el proceso de neurodegeneración durante la fase crónica de la ELT. En relación con esto, cualitativamente se observó una reducción en la sobrevivencia neuronal en CA1, CA3 e Hilus de las ratas epilépticas.

El tratamiento con el LEV disminuyó el número de células FJB+ e incrementó, cualitativamente, la sobrevivencia neuronal en dichas capas, teniendo efectos neuroprotectores en la FH de ratas con ELT durante la fase crónica.

Realizar un conteo de las células NeuN+ por estereología proporcionaría una mejor perspectiva del efecto del LEV en la supervivencia neuronal. Asimismo, es importante continuar evaluando los efectos del LEV en la neuroinflamación y estrés oxidativo para determinar si de este modo se evita la muerte neuronal, así como evaluar si el LEV influye en la memoria y aprendizaje al ser un fármaco neuroprotector.

REFERENCIAS

- Amaral, D., & Lavenex, P. (2007). Hippocampal neuroanatomy, in *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, Editors, Andersen P, Morris R, Amaral D, bliss T, O'Keefe J. New York p. 51.
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (Eds.). (2006). *The hippocampus book*. Oxford university press.
- Belcastro, V., Pierguidi, L., & Tambasco, N. (2011). Levetiracetam in brain ischemia: clinical implications in neuroprotection and prevention of post-stroke epilepsy. *Brain and Development*, 33(4), 289-293.
- Blümcke, I., Thom, M., Aronica, E., Armstrong, D. D., Bartolomei, F., Bernasconi, A., ... & Spreafico, R. (2013). International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*, 54(7), 1315-1329.

- Browning, M., Shear, D. A., Bramlett, H. M., Dixon, C. E., Mondello, S., Schmid, K. E., ... & Kochanek, P. M. (2016). Levetiracetam treatment in traumatic brain injury: operation brain trauma therapy. *Journal of neurotrauma*, 33(6), 581-594.
- Cavalheiro, E. A., Naffah-Mazzacoratti, M. G., Mello, L. E., & Leite, J. P. (2006). The Pilocarpine Model of Seizures. *Models of Seizures and Epilepsy*, 433–448.
- Chen, Y. H., Huang, E. Y. K., Kuo, T. T., Hoffer, B. J., Wu, P. J., Ma, H. I., ... & Chiang, Y. H. (2016). Levetiracetam prophylaxis ameliorates seizure epileptogenesis after fluid percussion injury. *Brain research*, 1642, 581-589.
- Cid, E., Marquez-Galera, A., Valero, M., Gal, B., Medeiros, D. C., Navarron, C. M., ... & Liset, M. (2021). Sublayer-and cell-type-specific neurodegenerative transcriptional trajectories in hippocampal sclerosis. *Cell Reports*, 35(10), 109229.
- Clifford, D. B., Olney, J. W., Maniotis, A., Collins, R. C., & Zorumski, C. F. (1987). The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience*, 23(3), 953-968.
- Contreras-García, I. J., Cárdenas-Rodríguez, N., Romo-Mancillas, A., Bandala, C., Zamudio, S. R., Gómez-Manzo, S., Hernández-Ochoa, B., Mendoza-Torreblanca, J. G., & Pichardo-Macías, L. A. (2022). Levetiracetam Mechanisms of Action: From Molecules to Systems. *Pharmaceuticals*, 15(4), Art.4.
- Covolan, L., & Mello, L. E. A. (2000). Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Research*, 39(2), 133–152.
- Cruz, A. G. J. (2023) Efecto del Levetiracetam Sobre la Glía en el Hipocampo de Ratas con Epilepsia del Lóbulo Temporal. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Cruz-Cruz, M. del R., Gallardo-Elías, J., Paredes-Solís, S., Legorreta-Soberanis, J., Flores-Moreno, M., Andersson, N., (2017). Factores asociados a epilepsia en niños en México: Un estudio caso-control. *Boletín del Hospital Infantil de México*, 74(5), 334-3340.
- Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R. S., & Avoli, M. (2008). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of neuroscience methods*, 172(2), 143-157.
- De Groot, M., Aronica, E., Heimans, J. J., & Reijneveld, J. C. (2011). Synaptic vesicle protein 2A predicts response to levetiracetam in patients with glioma. *Neurology*, 77(6), 532-539.
- Dekeyser, S., De Kock, I., Nikoubashman, O., Vanden Bossche, S., Van Eetvelde, R., De Groote, J., ... & Achten, E. (2017). “Unforgettable”—a pictorial essay on anatomy and pathology of the hippocampus. *Insights into imaging*, 8(2), 199-212.

- Deshpande, L. S., & DeLorenzo, R. J. (2014). Mechanisms of levetiracetam in the control of status epilepticus and epilepsy. *Frontiers in neurology*, 5, 11.
- Devinsky, O., Vezzani, A., O'Brien, T. J., Jette, N., Scheffer, I. E., de Curtis, M., & Perucca, P. (2018). Epilepsy. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 18024.
- Dingledine, R., Varvel, N. H., & Dudek, F. E. (2014). When and how do seizures kill neurons, and is cell death relevant to epileptogenesis?. *Issues in clinical epileptology: a view from the bench*, 109-122.
- Estrada-Castillejos, M., Soler-Huerta, E., Gómez-Márquez, M., Molar-Castro, F., Sainz-Vázquez, L., & González-Contreras, H. (2010). Epilepsy and remission in primary care level. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 48(2), 189-192.
- Faure, J. B., Akimana, G., Carneiro, J. E., Cosquer, B., Ferrandon, A., Geiger, K., ... & Nehlig, A. (2013). A comprehensive behavioral evaluation in the lithium-pilocarpine model in rats: effects of carisbamate administration during status epilepticus. *Epilepsia*, 54(7), 1203-1213.
- Feria-Romero, I. A., Alonso-Vanegas, M., Rocha-Arrieta, L., Villeda-Hernández, J., Escalante-Santiago, D., Lorigados-Pedré, L., ... & Orozco-Suárez, S. (2013). Mecanismos de neurodegeneración en la epilepsia del lóbulo temporal. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 51(2), 137-148.
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., ... & Wiebe, S. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475-482.
- Gilbert, M. E., & Burdette, L. J. (1995). Hippocampal field potentials: a model system to characterize neurotoxicity. In *Neurotoxicology* (pp. 183-204). Academic Press.
- Glien, M., Brandt, C., Potschka, H., & Löscher, W. (2002). Effects of the novel antiepileptic drug levetiracetam on spontaneous recurrent seizures in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 43(4), 350-357.
- Grosser, S., Buck, N., Braunewell, K. H., Gilling, K. E., Wozny, C., Fidzinski, P., & Behr, J. (2020). Loss of long-term potentiation at hippocampal output synapses in experimental temporal lobe epilepsy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 143.
- Hanon, E., & Klitgaard, H. (2001). Neuroprotective properties of the novel antiepileptic drug levetiracetam in the rat middle cerebral artery occlusion model of focal cerebral ischemia. *Seizure*, 10(4), 287-293.
- Henshall, D. C., & Simon, R. P. (2005). Epilepsy and apoptosis pathways. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 25(12), 1557-1572.
- Hernández, J. D. O., Aguilar, E. J., & García, F. G. (2015). El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Rev Med UV*, 21-28.

- Holmes, G. L. (2015). Cognitive impairment in epilepsy: the role of network abnormalities. *Epileptic Disorders*, 17(2), 101-116.
- Howard, P., Remi, J., Remi, C., Charlesworth, S., Whalley, H., Bhatia, R., ... Wilcock, A. (2018). Levetiracetam. *Journal of Pain and Symptom Management*.
- Itoh, K., Inamine, M., Oshima, W., Kotani, M., Chiba, Y., Ueno, M., & Ishihara, Y. (2015). Prevention of status epilepticus-induced brain edema and neuronal cell loss by repeated treatment with high-dose levetiracetam. *Brain Research*, 1608, 225-234.
- Itoh, K., Ishihara, Y., Komori, R., Nochi, H., Taniguchi, R., Chiba, Y., ... & Kataoka, Y. (2016). Levetiracetam treatment influences blood-brain barrier failure associated with angiogenesis and inflammatory responses in the acute phase of epileptogenesis in post-status epilepticus mice. *Brain Research*, 1652, 1-13.
- Izquierdo, A. Y. (2005). Crisis convulsivas. Concepto, clasificación y etiología. 6.
- Johannessen Landmark, C., & Patsalos, P. N. (2010). Drug interactions involving the new second-and third-generation antiepileptic drugs. *Expert review of neurotherapeutics*, 10(1), 119-140.
- Jessen, K. R. (2004). Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(10), 1861-1867.
- Jope, R. S., Morrisett, R. A., & Snead, O. C. (1986). Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Experimental Neurology*, 91(3), 471-480.
- Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284(2), 474-479.
- Kilicdag, H., Dagliloglu, K., Erdogan, S., Guzel, A., Sencar, L., Polat, S., & Zorludemir, S. (2013). The effect of levetiracetam on neuronal apoptosis in neonatal rat model of hypoxic ischemic brain injury. *Early Human Development*, 89(5), 355-360.
- Klitgaard, H., & Pitkänen, A. (2003). Antiepileptogenesis, neuroprotection, and disease modification in the treatment of epilepsy: focus on levetiracetam. *Epileptic disorders*, 5(1), 9-16.
- Kim, J. E., Choi, H. C., Song, H. K., Jo, S. M., Kim, D. S., Choi, S. Y., ... & Kang, T. C. (2010). Levetiracetam inhibits interleukin-1 β inflammatory responses in the hippocampus and piriform cortex of epileptic rats. *Neuroscience letters*, 471(2), 94-99.
- Lee, D. S., Ryu, H. J., Kim, J. E., Choi, H. C., Kim, Y. I., Song, H. K., & Kang, T. C. (2013). The effect of levetiracetam on status epilepticus-induced neuronal death in the rat hippocampus. *Seizure*, 22(5), 368-377.
- Leite, J. P., Bortolotto, Z. A., & Cavalheiro, E. A. (1990). Spontaneous recurrent seizures in rats: An experimental model of partial epilepsy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 14(4), 511-517.

- López-Meraz, M. L., Medel-Matus, J. S., & Niquet, J. (2016). Inflammatory Cytokines as Targets for Epilepsy Drug Therapy. In *Antiepileptic Drug Discovery* (pp. 3-22). Humana Press, New York, NY.
- López-Meraz M.L., R.L., Miquel M., Hernandez, M.E., Toledo R., Coria-Avila, Garcia L. I., Perez C. A., Aranda G. E. y Manzo J. (2009). Conceptos básicos de la epilepsia. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 9(2): p. 31-37.
- Lyseng-Williamson, K. A. (2011). Levetiracetam: a review of its use in epilepsy. *Drugs*, 71, 489-514.
- Löscher, W., Hönack, D., & Rundfeldt, C. (1998). Antiepileptogenic effects of the novel anticonvulsant levetiracetam (ucb L059) in the kindling model of temporal lobe epilepsy.
- Malmgren, K., & Thom, M. (2012). Hippocampal sclerosis—Origins and imaging. *Epilepsia*, 53(s4), 19-33.
- Margineanu, D. G., & Klitgaard, H. (2000). Inhibition of neuronal hypersynchrony in vitro differentiates levetiracetam from classical antiepileptic drugs. *Pharmacological Research*, 42(4), 281-285.
- Meehan, A. L., Yang, X., McAdams, B. D., Yuan, L., & Rothman, S. M. (2011). A new mechanism for antiepileptic drug action: vesicular entry may mediate the effects of levetiracetam. *Journal of neurophysiology*, 106(3), 1227-1239.
- Meehan, A. L., Yang, X., Yuan, L. L., & Rothman, S. M. (2012). Levetiracetam has an activity-dependent effect on inhibitory transmission. *Epilepsia*, 53(3), 469-476.
- Mohammad, H. M., Sami, M. M., Makary, S., Toraih, E. A., Mohamed, A. O., & El-Ghaiesh, S. H. (2019). Neuroprotective effect of levetiracetam in mouse diabetic retinopathy: Effect on glucose transporter-1 and GAP43 expression. *Life sciences*, 232, 116588.
- Oliveira, A. A., Almeida, J. P. C., Freitas, R. M., Nascimento, V. S., Aguiar, L. M. V., Júnior, H. V. N., ... & Fonteles, M. M. F. (2007). Effects of levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite–nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after pilocarpine-induced seizures. *Cellular and molecular neurobiology*, 27(3), 395-406.
- Pardo-Peña, K., Martínez-Gallegos, S. M., & Noriega-Ruiz, M. A. (2022). Efecto de los antioxidantes en la epilepsia del lóbulo temporal: Effect of antioxidants in temporal lobe epilepsy. *e-CUCBA*, (18), 177-191.
- Patel, M. (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(12), 1951-1962.
- Pereno, G. L. (2010). Fisiopatología de la epilepsia del lóbulo temporal: revisión del proceso de muerte neuronal a la neuroplasticidad. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, 2(1), 46-57.

- Pichardo-Macías, L. A., Contreras-García, I. J., Zamudio, S. R., Mixcoha, E., & Mendoza-Torreblanca, J. G. (2016). Synaptic Vesicle Protein 2A as a novel pharmacological target with broad potential for new antiepileptic drugs. In *Antiepileptic Drug Discovery* (pp. 53-81). Humana Press, New York, NY: Springer Nature.
- Potschka, H., Baltés, S., & Löscher, W. (2004). Inhibition of multidrug transporters by verapamil or probenecid does not alter blood-brain barrier penetration of levetiracetam in rats. *Epilepsy research*, 58(2-3), 85-91.
- Rho, J., Sankar, R., & Stafstrom, C. E. (Eds.). (2010). *Epilepsy: mechanisms, models, and translational perspectives*. CRC Press.
- Rigo, J. M., Hans, G., Nguyen, L., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., ... & Klitgaard, H. (2002). The anti-epileptic drug levetiracetam reverses the inhibition by negative allosteric modulators of neuronal GABA-and glycine-gated currents. *British journal of pharmacology*, 136(5), 659- 672.
- Sanchez, P. E., Zhu, L., Verret, L., Vossel, K. A., Orr, A. G., Cirrito, J. R., ... & Mucke, L. (2012). Levetiracetam suppresses neuronal network dysfunction and reverses synaptic and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(42), E2895-E2903.
- Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y., & Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512-521.
- Scorza, F. A., Arida, R. M., Naffah-Mazzacoratti, M. da G., Scerni, D. A., Calderazzo, L., & Cavalheiro, E. A. (2009). The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 81(3), 345–365.
- Shetty, A. K. (2013). Prospects of levetiracetam as a neuroprotective drug against status epilepticus, traumatic brain injury, and stroke. *Frontiers in Neurology*, 4, 172.
- Sirven, J. I., & Osborne, P. (2014). What is Epilepsy? Disease or Disorder? Epilepsy Foundation. <https://www.epilepsy.com/learn/about-epilepsy-basics/what-epilepsy>
- Sloviter, R. S. (2008). Hippocampal epileptogenesis in animal models of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: the importance of the “latent period” and other concepts. *Epilepsia*, 49, 85-92.
- Smolensky, I. V., Zubareva, O. E., Kalemenev, S. V., Lavrentyeva, V. V., Dyomina, A. V., Karepanov, A. A., & Zaitsev, A. V. (2019). Impairments in cognitive functions and emotional and social behaviors in a rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Behavioural Brain Research*, 112044. doi:10.1016/j.bbr.2019.112044

- Stafstrom, C. E. (2004). An introduction to seizures and epilepsy: cellular mechanisms underlying classification and treatment. *Epilepsy and the Ketogenic Diet*, 3-30.
- Stafstrom, C. E. (2010). Pathophysiological mechanisms of seizures and epilepsy: A primer. In *Epilepsy: Mechanisms, Models, and Translational Perspectives* (pp. 3-19). CRC Press.
- Stafstrom, C. E., & Rho, J. M. (2004). *Epilepsy and the Ketogenic Diet*. Springer Science & Business Media.
- Stratton, S. C., Large, C. H., Cox, B., Davies, G., & Hagan, R. M. (2003). Effects of lamotrigine and levetiracetam on seizure development in a rat amygdala kindling model. *Epilepsy research*, 53(1-2), 95-106.
- Strużyńska, L. (2009). A glutamatergic component of lead toxicity in adult brain: the role of astrocytic glutamate transporters. *Neurochemistry international*, 55(1-3), 151-156.
- Surges, R., Volynski, K. E., & Walker, M. C. (2008). Is levetiracetam different from other antiepileptic drugs? Levetiracetam and its cellular mechanism of action in epilepsy revisited. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 1(1), 13-24.
- Téllez-Zenteno, J. F., & Hernández-Ronquillo, L. (2011). A Review of the Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy Research and Treatment*, 2012, e630853.
- Thom, M. (2014). Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(5), 520-543.
- Turski, W. A., Cavalheiro, E. A., Schwarz, M., Czuczwar, S. J., Kleinrok, Z., & Turski, L. (1983). Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behavioural brain research*, 9(3), 315-335.
- Wakita, M., Kotani, N., Kogure, K., & Akaike, N. (2013). Inhibition of Excitatory Synaptic Transmission in Hippocampal Neurons by Levetiracetam Involves Zn²⁺-Dependent GABA Type A Receptor-Mediated Presynaptic Modulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 348(2), 246–259. doi:10.1124/jpet.113.208751
- Walker, M. (2007). Neuroprotection in epilepsy. *Epilepsia*, 48, 66-68.
- Wang, H., Gao, J., Lassiter, T. F., McDonagh, D. L., Sheng, H., Warner, D. S., ... & Laskowitz, D. T. (2006). Levetiracetam is neuroprotective in murine models of closed head injury and subarachnoid hemorrhage. *Neurocritical care*, 5(1), 71-78.
- Wang, L., Liu, Y. H., Huang, Y. G., & Chen, L. W. (2008). Time-course of neuronal death in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using Fluoro-Jade C staining. *Brain research*, 1241, 157-167.
- Willmore, L. J. (2005). Antiepileptic drugs and neuroprotection: current status and future roles. *Epilepsy & Behavior*, 7, 25-28.

World Health Organization. (9 February 2022). Epilepsy. Disponible en:

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>

Yao, X., Yang, W., Ren, Z., Zhang, H., Shi, D., Li, Y., ... & Ren, K. (2021). Neuroprotective and angiogenesis effects of levetiracetam following ischemic stroke in rats. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 638209.

Zamudio, S. R., Pichardo-Macías, L. A., Díaz-Villegas, V., Flores-Navarrete, I. L., & Guzmán-Velázquez, S. (2019). Subchronic cerebrolysin treatment alleviates cognitive impairments and dendritic arborization alterations of granular neurons in the hippocampal dentate gyrus of rats with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 97, 96-104.

ANEXO 1: Soluciones para la inmunohistoquímica

- Peróxido de hidrógeno al 3%: Se utiliza PBT para diluir el peróxido de hidrógeno hasta obtenerlo en una concentración del 3%.
- Suero de bloqueo: Se prepara con SFB al 5%. El SFB se encuentra al 100%, por lo tanto se diluye con PBT. Esta solución también se utiliza para la preparación del anticuerpo primario y secundario.
- Anticuerpo primario y secundario: La dilución utilizada fue de 1:500 (en ambos casos), y se realiza con la solución de bloqueo; 1 µl de anticuerpo en 500 µl de solución.
- Avidina-Biotina: Se prepara con 2.5 µl de Avidina y 2.5 µl de Biotina por cada ml de PBT. Primero es necesario incubar la Avidina y Biotina durante 30 minutos, para posteriormente agregar el PBT y revolver en el Roto-Shake.
- DAB: Se requieren 16 µl de cada reactivo por cada ml de agua destilada. Los reactivos deben ser agregados con un orden específico: 1 Buffer, 2 DAB, 3 Peróxido de Hidrógeno y 4 Nikkel.

ANEXO 2: Soluciones para la tinción de Fluoro-Jade B

- Alcohol básico: Se prepara a partir de una solución de hidróxido de sodio al 5% con etanol, en un porcentaje de 20% y 80% respectivamente.
- Stock de permanganato de potasio 0.6%: Esta es la solución madre, se prepara disolviendo 600 mg de permanganato de potasio en 100 ml de agua destilada. La solución debe ser filtrada y envasada en un frasco ámbar que requiere ser almacenado en oscuridad.
- Solución de permanganato de potasio 0.06%: Se prepara a partir de la solución madre (0.6%) en una dilución de 1:9 con agua destilada (10 ml

de stock y 90 ml de agua destilada). Debe prepararse el mismo día que se va a utilizar.

- Ácido acético 0.1%: Drive para la preparación de la solución de FJB 0.0004%. Se mezcla 1 parte de ácido acético glacial en 499 partes de agua destilada. Por ejemplo, para preparar 250 ml de ácido acético 0,1%, se debe disolver 0.25 ml de ácido acético glacial en 249.75 ml de agua destilada.
- Stock de FJB 0.01%: Se requiere disolver 10 mg del reactivo en polvo de FJB en 100 ml de agua destilada. Se necesita filtrar con una membrana de 0.45 μm , y almacenar en refrigeración (4°C) y en un frasco cubierto con aluminio. Si la solución se enturbia o el reactivo se precipita debe ser descartada.
- Solución de FJB 0.0004%: Se prepara utilizando el ácido acético 0.1% y el Stock de FJB 0.01%, en un porcentaje de 96% y 4% respectivamente. Por ejemplo, al preparar 210 ml se requieren 8.4 ml del Stock y 201.6 ml de ácido acético 0.1%.

Consideraciones en el procedimiento:

Durante el desarrollo de esta técnica los tejidos se dañan, por lo tanto se recomienda que los cortes sean grandes y no únicamente la región de interés. Además, para evitar confundir los tejidos de los distintos grupos, se debe realizar el procedimiento por separado.

El frasco coplin donde se coloque la solución de permanganato de potasio debe ser de vidrio y se necesita cubrir con aluminio. Asimismo, el vaso coplin que contenga la solución de FJB 0.0004% se tiene que cubrir con aluminio y cuando las laminillas están sumergidas se recomienda hacerlo en un lugar oscuro.

ANEXO 3: Cuantificación de la densidad óptica relativa con el programa ImageJ

1. Abrir la imagen: Seleccionar la opción "File" del menú y después "Open", esto abrirá una ventana para elegir la imagen que se desea analizar. También se puede hacer con Ctrl+O. Al seleccionar la imagen se debe dar en "open".
2. Pasar la imagen a 8-bit: Seleccionar en el menú la opción "Image", posteriormente seleccionar "Type" y "8 bit".
3. Calibrar: Seleccionar "Analyze" en el menú y elegir la opción "Calibrate". En "function" se debe poner "uncalibrated OD" y en "unit: Gray value", es necesario seleccionar "Global calibration, OK, list".
4. Abrir ROI manager: Seleccionar "Analyze" en el menú, elegir la opción "Tools" y posteriormente "ROI manager". También se puede hacer con Ctrl+T.
5. Delimitar las capas: Utilizando la herramienta "Polygon" se dibuja la capa de interés y debe ser agregada al ROI manager seleccionando "Add". Esto se tiene que repetir para cada una de las capas.
6. Densidad óptica: Para medir la densidad óptica de cada área dibujada anteriormente, seleccionar la opción "measure" lo que va a desplegar una ventana donde se indica la densidad óptica relativa.

Si se requiere analizar más de una imagen no es necesario volver a calibrar, únicamente se debe calibrar si cierras el programa.