



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DEL EXTRACTO DE *Aristotelia chilensis*
(MAQUI BERRY) Y DAPSONA EN UN MODELO DE
STATUS EPILEPTICUS INDUCIDO CON ÁCIDO
KAÍNICO EN RATAS NEONATAS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

LUIS ANGEL BAUTISTA OROZCO



**TUTOR
DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por todos los retos impuestos y las oportunidades dadas que me han hecho llegar hasta donde me encuentro ahora.

A mi tutora, la Dra. Sandra Adela Orozco Suárez por recibirme y creer en mí para formar parte de su grupo de trabajo así como también por su apoyo incondicional, conocimientos y consejos dados.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social por brindarnos la oportunidad de realizar este trabajo de investigación.

A todos mis profesores de la Facultad de Ciencias, por brindarme los conocimientos teóricos y prácticos para que yo pudiera realizar este trabajo.

A los miembros del jurado por tomarse el tiempo de leer y revisar esta tesis y dar sus mejores consejos y correcciones.

A los doctores que laboran en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas: Dr. Israel Grijalva, Dra. Paola García, Dra. Patricia Campos, Dra. Hermelinda Salgado y la Dra. Iris Feria, por sus consejos y charlas durante la realización de mi trabajo.

Al técnico Carmen Baltazar por apoyarme de manera incondicional en parte del trabajo de mi tesis.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Nahui, Mariana, Rafael y Azul, por su apoyo, charlas y consejos que me ayudaron a concluir este trabajo de manera exitosa.

DEDICATORIAS

A mi madre María Guadalupe Orozco, por su apoyo incondicional a pesar de las adversidades, por siempre apoyarme y entenderme, por jamás dejar que me rindiera y que siempre siguiera adelante, por siempre creer en mí y jamás abandonarme, por todas las levantadas temprano y las desveladas; este logro es de los dos. Te amo mamá y por ti pude realizar todo esto y por ti seguiré adelante.

A mis hermanos Israel, Laura, Leonardo y Lalo por ser mis padres postizos, por cuidarme cuando niño, por siempre estar al pendiente de mí y por todo el apoyo y cariño que me han dado. Esto es por ustedes, seguí su ejemplo. Los amo.

A mi compañero de vida Hiram Ruán, por llegar en el mejor momento de mi vida y ayudarme a crecer y ser mejor persona cada día, por apoyarme en las situaciones más difíciles y que a pesar de la distancia siempre has estado a mi lado. Sin ti no hubiera podido concluir, sin ti nada hubiera sido igual.

A mi mejor amigo Mauricio Vázquez por ser mi confidente personal, por siempre soportarme en mis peores momentos y por todas las experiencias increíbles que jamás olvidaré.

A mis amigos Eileen Terrazas, Olivia Rojas, Saúl Castillo, Antonio Fuentes, Diana Jurado, Manuel Maldonado, Cristina Bastida, Alma García, Dinora Mejía, Daniela Sclavo y Mauricio López Portillo por hacer de mi estancia en la Universidad algo inolvidable.

ÍNDICE

1. RESUMEN	6
2. ANTECEDENTES	9
2.1 EPILEPSIA	9
2.2 CRISIS NEONATALES	10
2.3 ESTADO EPILEPTICO (<i>Status Epilepticus</i>)	12
2.4 EPILEPTOGÉNESIS	14
2.5 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA EPILEPSIA	15
2.5.1 MODELO DE ÁCIDO KAÍNICO	15
2.6 NEUROINFLAMACIÓN EN LA EPILEPTOGÉNESIS	18
2.6.1 IL-1β (INTERLEUCINA 1 β)	21
2.6.2 NFκB (NUCLEAR FACTOR κ B)	22
2.6.3 COX-2 (CICLOOXIGENASA 2)	24
2.7 ANTIEPILEPTOGÉNESIS	25
2.7.1 TRATAMIENTOS ANTIEPILEPTOGÉNICOS	25
2.7.2 DAPSONA	26
2.7.3 EXTRACTO DE <i>Aristotelia chilensis</i> (MAQUI BERRY)	27
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
5. HIPOTESIS	29
6. OBJETIVOS	30
7. MÉTODOS	31
7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	31
7.2 UNIVERSO DE ESTUDIO	31
7.2.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	31
7.2.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	31
7.2.4 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	32
7.2.5 VARIABLES DEPENDIENTES	32
7.2.6 VARIABLES INDEPENDIENTES	32
7.3 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	32
7.3.1 GRUPO CONTROL (C)	33
7.3.2 GRUPO CONTROL DE ÁCIDO KAÍNICO (AK)	33
7.3.3 GRUPO ÁCIDO KAÍNICO + MAQUI BERRY (AKMB)	34
7.3.4 GRUPO ÁCIDO KAÍNICO + DAPSONA (AKD)	34
7.3.5 GRUPO ÁCIDO KAÍNICO + MAQUI BERRY + DAPSONA (AKMBD)	34
7.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS	35
7.5 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD CONVULSIVA	35
7.6 WESTERN BLOT	36
7.6.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	36
7.6.2 ELECTROFORESIS	37

7.6.3 INCUBACIÓN Y ANÁLISIS -----	37
7.7 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS -----	38
7.7.1 TINCIÓN DE FLUORO-JADE -----	38
7.7.2 INMUNOFLUORESCENCIAS -----	39
7.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO -----	40
8. RESULTADOS -----	40
8.1 EFECTOS COLATERALES DE LOS TRATAMIENTOS -----	40
8.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CONVULSIVA -----	43
8.2.1 FRECUENCIA DE CONVULSIONES AL DÍA 17 PN -----	43
8.2.2 FRECUENCIA DE CONVULSIONES AL DÍA 32 PN -----	44
8.3 EVALUACIÓN DEL DAÑO NEURONAL -----	48
8.4 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS PROINFLAMATORIAS -----	56
8.4.1 WESTERN BLOT -----	56
8.4.2 INMUNOFLUORESCENCIAS -----	60
9. DISCUSIÓN -----	64
10. CONCLUSIONES -----	69
11. BIBLIOGRAFÍA -----	70

ABREVIATURAS

AK	Ácido kaínico
AKD	Ácido kaínico más dapsona
AKMB	Ácido kaínico más extracto de Maqui berry
AKMBD	Ácido kaínico más extracto de Maqui berry más dapsona
AP-1	Factor de transcripción (Activator protein 1)
APCs	Células presentadoras de antígenos
Ca²⁺	Ion Calcio
cAMP	Adenosin monofosfato cíclico
CCC	Cotransportadores catión cloruro
Cl⁻	Ion Cloro
COX2	Ciclooxigenasa 2
DDS	4,4'- diamino-difeni-sulfona
EP1-2	Receptores a prostaglandina tipo 1 y tipo 2
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
HE	Hematoxilina y Eosina
HMGB1	Anfoterina (High mobility group box 1)
IL-1R1	Receptor de IL-1 tipo 1
IL-1β	Interleucina 1 beta
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
K⁺	Ion Potasio
KARs	Receptores a kainato
KCC2	Cotransportador de potasio y cloro
Mg²⁺	Ion Magnesio
Na⁺	Ion Sodio
NFκB	Factor nuclear kappa B
NK	Natural killer
NKCC1	Cotransportadore de sodio, potasio y cloro
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
PGE	Prostaglandina E
PN	Postnatal
SE	Status Epilepticus
SNC	Sistema nervioso central
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta 1
TLRs	Receptores tipo Toll

1. RESUMEN

Introducción: La inflamación es un factor clave en la epileptogénesis; promueve un aumento en la excitabilidad neuronal, reduce el umbral convulsivo y está involucrada en los cambios moleculares y estructurales que se dan en el proceso de la epileptogénesis. El rol funcional de la inflamación cerebral ha sido evidenciado por el uso de tratamientos antiinflamatorios e inmunosupresivos durante el periodo neonatal, cuando el cerebro es más susceptible debido a las características anatómicas y fisiológicas que facilitan el desarrollo de las crisis.

Objetivo: Evaluar el efecto neuroprotector, antiinflamatorio y anticonvulsivante a corto y largo del extracto de *Aristotelia chilensis* (Maqui berry) y dapsona sobre la epileptogénesis asociada al daño producido por el status epilepticus inducido con ácido kaínico en ratas neonatas.

Métodos: 96 ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 12 días postnatal (PN) entre 24 y 26 g fueron empleadas y divididas en 5 grupos: Grupo C, grupo AK, grupo AKMB, grupo AKD y grupo AKMBD con 3 cortes de tiempo (24 h, 5 días y 20 días). El ácido kaínico fue administrado en una sola ocasión en una dosis de 3 mg / kg para inducir status epilepticus (Fase V). La actividad convulsiva fue evaluada diariamente durante los lapsos ya establecidos. Alcanzados los cortes de tiempo, los animales se sacrificaron y los cerebros fueron obtenidos por craneotomía; algunos fueron procesados para obtener cortes histológicos (hematoxilina y eosina, tinción de Fluoro-Jade, inmunofluorescencias contra NFkB, IL-1 β y COX2 e inmunohistoquímica contra GFAP) mientras que otros fueron diseccionados en hipocampo, amígdala y corteza temporal para el análisis de las proteínas NFkB, IL-1 β y COX2 mediante Western Blot.

Resultados: La dapsona redujo el número de convulsiones a los 17 y 32 días PN, redujo el número de células en proceso de degeneración en todas las estructuras estudiadas y también redujo la expresión relativa de proteínas proinflamatorias a las 24 h posteriores a la inyección de ácido kaínico. El extracto de Maqui berry redujo, en menor grado comparado con la dapsona, el número de convulsiones a los 17 y 32 días PN, el número de células en proceso de degeneración y la expresión relativa de proteínas proinflamatorias a las 24 h posteriores a la inyección de ácido kaínico. El tratamiento resultante de la combinación del extracto de Maqui berry y la dapsona mostró un efecto antagónico.

Conclusiones: La dapsona posee un efecto anticonvulsivante, neuroprotector y antiinflamatorio mientras que el extracto de Maqui berry posee los mismos efectos que la dapsona pero en menor grado. Este estudio sugiere que una intervención oportuna sobre la regulación de las vías de inflamación reduce el riesgo de desarrollar epilepsia.

ABSTRACT

Introduction: Clinical and experimental evidence establishes inflammation as a key factor in epileptogenesis; it promotes in the brain an increase in neuronal excitability, reduces the seizure threshold and it's involved in molecular and structural changes of epileptogenesis. The functional role of brain inflammation has been influenced by the use of anti-inflammatory and immunosuppressive treatments during neonatal period, when the brain is more susceptible due to the anatomical and physiological features that facilitate the development of seizures. **Objective:** To evaluate the neuroprotective, anti-inflammatory and anticonvulsant effect of *Aristotelia chilensis* (Maqui berry) extract and dapsone on the epileptogenesis associated to the damage produced by status epilepticus induced with kainic acid in neonate rats. **Methods:** 96 male Sprague Dawley rats 12 days old (24 – 26g) were used and divided into 5 groups: C group, AK group, AKMB group, AKD group and AKMBD group with 3 time cuts (24 h, 5 days and 20 days). The kainic acid was administered once with a 3 mg/kg dose to induce status epilepticus. Seizure activity was assessed dialy for the established time cuts. Reached those time cuts, the animals were sacrificed and the brains were obtained by craniotomy and some of them were processed for histological techniques (hematoxylin and eosin, Fluoro-Jade staining, immunofluorescences for NFkB, IL-1 β and COX2 and immunohistochemistry for GFAP) while in some others the hippocampus, the temporal cortex and amygdala were removed for NFkB, IL-1 β and COX2 protein analysis with Western Blot. **Results:** Dapsone reduced the number of seizures at 17 and 32 PN days, the number of cells on degeneration process in all analyzed structures and also reduced the relative expression of pro-inflammatory proteins at 24 h after the kainic acid injection. The Maqui berry extract reduced, in a less way than dapsone, the number of seizures at 17 and 32 PN days, the number of cells on degeneration process and the relative expression of pro-inflammatory proteins at 24 h after kainic acid injection. The treatment resulting from the combination of Maqui berry extract and dapsone showed an antagonistic effect. **Conclusions:** Dapsone has an anticonvulsant, neuroprotective and anti-inflammatory effect while the Maqui berry extract has the same effects showed by dapsone but in a less grade. This study suggests that an early intervention on the inflammation pathways reduces the risk of developing epilepsy.

2. ANTECEDENTES

2.1 EPILEPSIA

La epilepsia es la condición neurológica crónica, recurrente, de etiología diversa y asociada a descargas excitatorias anormales que causan un daño estructural con consecuencias neurológicas, cognitivas y psicológicas (Engel 2006; Panayiotopoulos 2012).

Una crisis epiléptica es una descarga eléctrica repentina y anormal en el cerebro, que puede originar alteraciones cerebrales y conductuales, manifestando cambios en la actividad motora, autonómica y/o conciencia. Esta suele manifestarse de manera similar en cada paciente, con un evento que tiene un patrón estereotipado y de duración breve (por lo general, menos de dos minutos) (Rosseti, 2010).

La epilepsia es uno de los padecimientos más comunes del sistema nervioso y representa en América Latina un problema de salud pública. Una cifra de prevalencia reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de 7 pacientes con epilepsia por cada 1000 personas a nivel mundial, que significa de 40 a 50 millones de pacientes con epilepsia en sus diferentes variedades. Sin embargo, estos valores aumentan en países en desarrollo (como los de América Latina) que llegan entre 14 y 57 pacientes con epilepsia por cada 1000 personas (Rubio et al, 2007).

En México, se calcula que aproximadamente entre 7% y 8% de la población padece algún trastorno del sistema nervioso. El Programa Prioritario de Epilepsia en México reporta que la prevalencia de epilepsia en el país es de 17 pacientes con epilepsia por cada 1000 personas siendo la población infantil la más afectada (Rubio et al, 2007). Se calcula que el número de pacientes con epilepsia es de alrededor de 1.5 millones con un pico de presencia en menores de un año de edad. El desarrollo del cerebro se encuentra en su mayor nivel de susceptibilidad durante los primeros años de vida, por lo que la incidencia de las crisis es más alta y disminuye cuando alcanza la adolescencia (Mizrahi, 1987).

2.2 CRISIS NEONATALES

Las crisis convulsivas neonatales se definen como una actividad anormal, paroxística y estereotipada de la función neurológica que ocurre en los primeros 28 días de vida o después de las 44 semanas de edad gestacional en infantes prematuros (Berg y Shinnar 1994; Holmes 1997; Arzimanoglou et al. 2005). Las crisis convulsivas en etapas tempranas no son espontáneas, más bien son provocadas por alteraciones en el medio extracelular de las neuronas, al igual que por el incremento rápido de la excitabilidad neuronal en respuesta a agentes nocivos. En México la incidencia se ha asociado a desordenes como hipoxia-isquemia, hipertermia, hemorragias subaracnoideas, desordenes cerebrovasculares, infecciones, hipercalcemia y trauma craneoencefálico. (Berg y Shinnar 1994; Holmes 1997). En la etapa neonatal estas crisis son potencialmente perjudiciales para el desarrollo del cerebro dado que la actividad neuronal es crítica para establecer las sinapsis (Volpe, 2008). En este periodo, el cerebro posee características anatómicas y fisiológicas que facilitan el desarrollo de crisis epilépticas: una mayor cantidad de sinapsis, mayor densidad de espinas dendríticas, expresión de canales iónicos excitatorios y de transportadores a niveles que promueven la excitación neuronal, mientras que los inhibitorios se encuentran cumpliendo funciones excitadoras al estar participando en el proceso de desarrollo (Hauser 1994; DeLorenzo et al. 1995; Jensen y Baram 2000; Holopainen 2008). El ácido γ -aminobutírico (GABA) en la etapa postnatal, a diferencia de su acción inhibitoria en la etapa adulta, tiene efectos despolarizantes que contribuyen al crecimiento neuronal, desarrollo, formación de redes e incluso a la alta susceptibilidad del cerebro inmaduro a las crisis (Ben-Ari et al. 1989; Ben-Ari y Holmes 2005).

El cambio de GABA de neurotransmisor excitatorio a inhibitorio ocurre en las dos primeras semanas de vida posnatal en roedores (Swann et al. 1989; Romijn et al. 1991; Ben-Ari 2006). La diferencia entre la acción excitatoria e inhibitoria, en el sistema nervioso central de neonatos y adultos respectivamente, se debe a la concentración de iones cloruro (Cl^-) de las neuronas inmaduras en comparación con las maduras, siendo mayor en las primeras (alrededor de 50mM) (Delpire & Mount, 2002). El GABA, como neurotransmisor excitatorio, tiene un papel importante en el desarrollo contribuyendo en la expresión de varias

funciones neuronales incluyendo la supervivencia celular, crecimiento dendrítico y el establecimiento de memoria a largo plazo.

En las neuronas, el GABA actúa uniéndose a los receptores GABA_A acoplados a canales de Cl⁻ provocando cambios conformacionales en estos canales que facilitan la entrada o salida de iones Cl⁻ dependiendo del potencial de equilibrio de la neurona. Este gradiente electroquímico de Cl⁻ es controlado por cotransportadores de catión-cloruro (CCCs). Cuando la concentración de Cl⁻ es alta, la apertura de los canales resulta en la despolarización de las neuronas por el flujo de salida de Cl⁻ mediado por el cotransportador K-Cl (KCC2). Cuando la concentración de Cl⁻ es baja, la activación de los receptores permite la entrada de los iones, dada principalmente por el cotransportador Na-K-Cl (NKCC1), lo que lleva a la hiperpolarización de la neurona (Zhu et al. 2005). Estos CCCs transportan iones Cl⁻ junto con iones de sodio o potasio a través de la membrana plasmática y juegan un papel en la regulación de la excitabilidad neuronal.

El NKCC1 es expresado durante el desarrollo en neuronas y glía en el encéfalo, mientras que el KCC2 tiene baja expresión durante la etapa postnatal y aumenta en neuronas maduras (Plotkin et al. 1997; Stein et al. 2004; Wang et al. 2011). Un cambio en la predominancia de la actividad neuronal de KCC2 a NKCC1, es ahora considerado como el mecanismo que lleva al cambio de señalización GABAérgica de excitatoria a inhibitoria. En esta etapa temprana GABA promueve un flujo de Cl⁻ que lleva a la despolarización de la membrana, lo cual genera potenciales de acción, activa directamente canales de calcio dependientes de voltaje y activa indirectamente receptores de glutamato NMDA removiendo los iones magnesio que obstruyen el receptor, aumentando el Ca²⁺ intracelular (Rivera et al. 1999; Lee et al. 2005). La elevación intracelular de calcio, promueve la diferenciación y supervivencia de las neuronas y es importante para mantener las conexiones sinápticas, por otro lado promueve un estado de hiperexcitación neuronal (Choi & Koh 2008).

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio predominante en el SNC. El papel del glutamato es indispensable para el desarrollo de una crisis convulsiva, ya que la refuerza y la sostiene. Durante una crisis convulsiva, la liberación de este neurotransmisor inicia

mecanismos fisiopatológicos como un estado de hiperexcitación permanente dando lugar a una sobreestimulación que puede llegar a provocar graves alteraciones en la actividad mitocondrial que repercuten en la supervivencia de la célula pudiéndola llevar a muerte por necrosis o apoptosis (Esclapez et al. 1999).

Los principales receptores presentes en este proceso son los ionotrópicos (iGLuRs); los N-Metil-D-Aspartato (NMDArs), los alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-1,4-isoxazol propionato (AMPA) y los receptores a kainato (Schwob et al. 1980; Engel 2004). Estos receptores están ligados a los canales que permiten el flujo de iones sodio (Na^+), potasio (K^+) y calcio (Ca^{+2}). Dichos receptores se encuentran involucrados en funciones de plasticidad celular, migración celular, en el sobre crecimiento neurítico y sobrevivencia neuronal (Schwob et al. 1980; Romijn et al. 1991; Tyzio et al. 1999; Engel 2004).

Durante la etapa del neurodesarrollo, las subunidades de glutamato se expresan de forma diferente a la etapa adulta. Estudios en modelos animales han demostrado que la expresión de los receptores a glutamato (Glu) es mayor en la segunda semana postnatal. En el cerebro inmaduro, la sobreexpresión de los receptores neuronales de NMDArs y AMPArs contribuye al incremento del flujo de calcio dentro de las células, lo cual disminuye el umbral de resistencia a las crisis convulsivas, e induce a su vez un daño excitotóxico e hipóxico-isquémico celular, seguido de la activación de una variedad de enzimas (quinasas, proteasas, óxido nítrico sintetasas, fosfatasas) y favorece la hiperexcitabilidad neuronal (Romijn et al. 1991; Volpe 2008). Estos procesos incrementan la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden dañar a la célula o llevarla a una muerte celular programada o apoptosis, proceso importante en el desarrollo de la epilepsia (Ben-Ari et al. 1981; Lothman & Collins 1981)

2.3 ESTADO EPILÉPTICO (*Status Epilepticus*)

El estado epiléptico (SE) es una condición epiléptica que se caracteriza por crisis agudas repetidas (parciales o generalizadas, convulsivas o no convulsivas) durante un periodo de más de 30 minutos sin recuperación entre ellas debido a la ausencia de un periodo interictal

(Capovilla, 2013). El SE es más común en niños que en adultos, con la mitad de los casos ocurridos en individuos menores de 2 años (Shinnar, 1997). En la literatura clínica, algunos reportes indican que el SE puede resultar en daño cerebral originando una discapacidad cognitiva a largo plazo y una permanente susceptibilidad a crisis futuras (Hesdorffer, 1998; Rice, 1998).

Igualmente, en estudios con roedores, los efectos fisiopatológicos del SE varían en función de la edad (Dos Santos, 2000) y dependiendo el objetivo de estudio se elige la edad adecuada del animal (Tchekalarova et al., 2010)

Algunos mecanismos involucrados en el SE son los siguientes (Neligan, 2010; Briggs, 2011):

a) Alteraciones en el ambiente iónico celular, tales como pérdida en las concentraciones y balance principalmente de Ca^+ y K^+ extra e intracelular, respectivamente, así como en el Na^+ , lo que resulta en una permeabilidad alterada de la membrana neuronal.

b) Por un lado, exagerada actividad excitatoria de neurotransmisores (NT) en relación con una mayor secreción de aspartato y glutamato dependientes de la entrada de Ca^+ , que actúan sobre receptores ionotrópicos y metabotrópicos, de los cuales el NMDA es el que se ha relacionado más con las crisis epilépticas; por otro lado, existe una disminución de la actividad y/o concentración de GABA.

c) Cambios estructurales en las neuronas caracterizadas por pérdida de las espinas dendríticas y la presencia de brotes axonales.

Sin embargo, estudios recientes reportan que existen otros fenómenos inmersos en este fenómeno, tales como:

a) La participación de la glía. Tomando en cuenta su papel fisiológico en los equilibrios hídrico, iónico y de los neurotransmisores de origen neuronal y glial en el microambiente neuronal (Losi, 2012).

b) El estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial son dos eventos que participan desfavorablemente en la propagación y perpetuación de la actividad epiléptica (Aguiar, 2012)

c) Disfunción de la barrera hematoencefálica que aumenta su permeabilidad a sustancias proinflamatorias que exacerban los fenómenos excitatorios (Friedman, 2012).

2.4 EPILEPTOGÉNESIS

Epileptogénesis se refiere a un proceso dinámico que progresivamente altera la excitabilidad neuronal, establece interconexiones críticas y produce cambios estructurales antes de que ocurra la primera convulsión espontánea (Engel, 2005), los cambios que se producen son la neurodegeneración, neurogenesis, gliosis, daño axonal, plasticidad dentrítica, daño en la barrera hematoencefálica, reclutamiento de células inflamatorias dentro del tejido nervioso y reorganización de la matriz extracelular (Lukasiuk, 2009).

Después de un insulto inicial se desencadena la actividad convulsiva inicial o aguda, seguida de un periodo latente o sin actividad convulsiva y subsecuentemente la expresión de convulsiones espontáneas con incremento de la frecuencia e intensidad de ellas (Jensen & Baram 2000).

Los cambios agudos se dan en las primeras horas en las que se presentan procesos como la inflamación, muerte neuronal, disminución del balance entre la excitación e inhibición neuronal, disminución del umbral de excitación neuronal y la activación de genes tempranos implicados en el neurodesarrollo, así como genes implicados en procesos de hiperexcitabilidad lo que establecería una retroalimentación para la recurrencia de las crisis (Esclapez et al. 1999; Jensen & Baram 2000). Los cambios subagudos se presentan dentro de las primeras semanas posteriores al insulto inicial donde se observa muerte neuronal por necrosis o apoptosis, principalmente en la región CA3 del hipocampo y en la corteza, alterando el balance entre excitación e inhibición de las redes neuronales. Los cambios crónicos se dan en las semanas y meses siguientes en los que se presenta neurogénesis, formación de fibras musgosas, reorganización de las redes neuronales, gliosis y modificaciones en las subunidades que componen a los receptores de GABA y glutamato que promueven la excitabilidad. Estos procesos pueden crear circuitos excitatorios recurrentes que favorecen la hiperexcitabilidad neuronal (Esclapez et al. 1999; Jensen & Baram 2000).

Estudios recientes establecen a la neuroinflamación como parte esencial en el proceso de epileptogénesis, que es un proceso dependiente de la liberación de citosinas y quimiosinas tales como IL-1 β y COX-2, se ha observado en modelos animales daño neuronal, astrogliosis, activación de la microglia así como una infiltración de leucocitos de la sangre al parénquima cerebral. (Marosso, 2011; Friedman, 2012)

2.5 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA EPILEPSIA

Como sucede con cualquier otra clase de fármacos, el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos que ayuden a los pacientes con epilepsia yace principalmente en el empleo de modelos animales para demostrar su eficacia y seguridad antes de su introducción en humanos voluntarios. Obviamente, entre más predictivo sea el modelo animal para un determinado tipo de crisis o síndrome, será mayor la probabilidad de que el fármaco a investigar demuestre su eficacia en estudios clínicos. Algunos modelos para el estudio de epilepsia son PTZ (pentilentetrazol), litio-pilocarpina, kindling amigdalino y ácido kaínico.

2.5.1 MODELO DE ÁCIDO KAÍNICO

Las crisis sintomáticas de la vida temprana pueden ser reproducidas en el cerebro de un animal en desarrollo por exposición a quimioconvulsivantes como el ácido kaínico (Engel 2004; Pitkänen et al. 2006). El modelo de ácido kaínico (AK) ha contribuido al entendimiento de los mecanismos moleculares, celulares y farmacológicos observados durante la epileptogénesis.

El AK fue aislado y extraído en el año 1950 de un alga roja (*Digenea simplex*) encontrada en aguas tropicales y sub-tropicales (Murakami et al. 1953). Este modelo experimental fue originalmente descubierto por Ben-Ari y Lagowska (Ben-Ari & Lagowska 1978; Ben-Ari et al. 1979) y es semejante a un modelo de epilepsia parcial compleja, agudo y crónico que se encuentra dentro de la clasificación de modelos químicos que reproduce a la epilepsia de lóbulo temporal (ELT) con los cambios histopatológicos típicos vistos en pacientes epilépticos (Nadler 1981; Ben-Ari 1985; Ben-Ari & Cossart 2000).

El AK (Figura 1) es un agonista de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos a kainato, los cuales pueden encontrarse en amígdala, corteza entorinal, ganglios basales, cerebelo y en hipocampo, en este último de forma abundante confiriéndole mayor vulnerabilidad al daño (Darstein et al. 2003; Bloss & Hunter 2010). Es de los modelos más utilizados para el estudio de la actividad epiléptica y neurodegeneración en ratas en desarrollo postnatal con edades de

5-20 días (Sperk et al. 1983; Sperk et al. 1985; Ben-Ari 1985). Se emplea para inducir convulsiones a partir de despolarizaciones que inician en el sistema límbico e incluso puede causar estado epiléptico (etapa aguda), el cual produce cambios neurales que promueven el proceso de epileptogénesis (etapa de latencia), dando lugar al desarrollo de crisis epilépticas espontáneas tras cinco días de tratamiento con este quimioconvulsivante (etapa crónica) y que pueden llevar eventualmente a la muerte celular (Ben-Ari et al. 1981; Lothman & Collins 1981; Velíšek et al., 2006; Zhang et al., 2011).

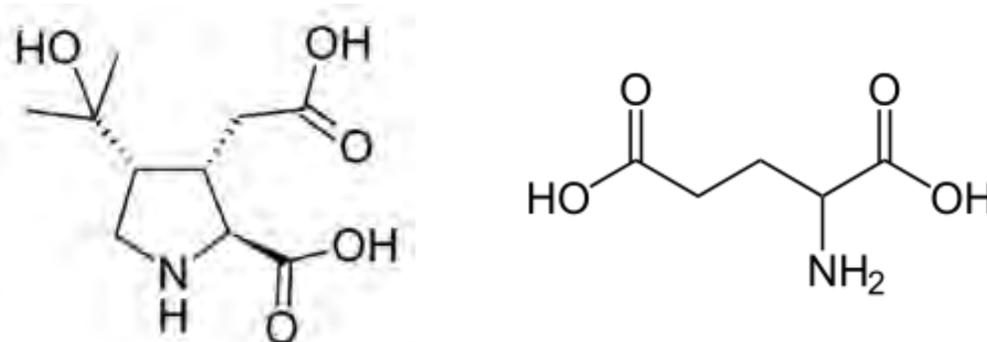


Figura 1. Estructura molecular del ácido kaínico (izquierda) y estructura molecular del glutamato (derecha). Se pueden notar las similitudes entre ambas moléculas en sus dos grupos carboxilo y su grupo amina.

La administración sistémica de AK promueve la esclerosis hipocampal caracterizada por muerte neuronal en CA1 y CA3 así como en diversas regiones del SNC, dispersión de células granulares y formación de fibras musgosas aberrantes (Berkovic et al. 1991; Buckmaster 2012). Los receptores a kainato (KARs) pueden encontrarse a diferentes niveles de expresión en la amígdala, corteza entorinal, hipocampo, ganglios basales y cerebelo. En el hipocampo las células piramidales de la región CA3 contienen el mayor número de KARs, tanto en las neuronas presinápticas como en la postsinápticas. KA1 y KA2 son las dos subunidades con mayor afinidad al glutamato y altamente expresadas en esta área lo cual la vuelve una zona altamente susceptible al daño excitotóxico inducido con el AK en este modelo. Esta actividad epileptiforme puede extenderse de CA3 a CA1 y otras estructuras límbicas (Ding et al. 1998; Bausch & McNamara 2004).

La activación de los KARs puede elevar la concentración intracelular de calcio y de especies reactivas de oxígeno, que pueden dañar las estructuras celulares; además de alterar la función

normal de las mitocondrias (Reynolds & Hastings 1995; Carriedo et al. 2000; Lauri et al. 2001; Zhang et al., 2011).

Otras características de ese modelo son la activación de la microglia, la proliferación de astrocitos, así como alteraciones en la función de ambos. La activación de la microglía contribuye a la neuroinflamación y neurodegeneración (Ravizza et al. 2005; Choi & Koh 2008) que induce inmediatamente la expresión y liberación de citosinas y moléculas proinflamatorias, como COX-2 que está involucrada en la muerte neuronal, en la recurrencia de las convulsiones y activa una cascada de procesos inflamatorios en el tejido cerebral que disminuye el umbral convulsivo y compromete la sobrevivencia neuronal (Penkowa et al., 2001; Kim et al. 2001; Riazi et al., 2010; Ravizza et al., 2011; Zhang et al., 2011).

Los cerebros de animales jóvenes presentan mayor excitabilidad que los cerebros adultos, y pueden desarrollar más fácilmente crisis espontáneas (Friedman et al., 1994; Ben-Ari, 2002; Mouri et al., 2008; Pernot et al., 2011). Las ratas en etapa juvenil son más susceptibles a los efectos del AK, como ya se ha mencionado, y esto puede deberse a los efectos excitatorios y despolarizantes de GABA sobre las neuronas, así como a la intensa sinaptogénesis durante el desarrollo (Ben-Ari, 2002; Ben-Ari & Holmes, 2005). En ratas adultas las crisis son no convulsivas en la etapa temprana (10 a 30 días después del tratamiento) pero se vuelven convulsivas durante la etapa tardía, en cambio en las ratas neonatas se observa la actividad convulsiva desde el inicio.

La principal ventaja de utilizar una administración sistémica de AK, en comparación con la administración intracerebral, es que no es necesario realizar procedimientos quirúrgicos lo cual elimina las complicaciones postquirúrgicas que puedan afectar la salud de animal o dañar el tejido mismo. Las ratas, después de ser tratadas con AK y llegar a etapa aguda, muestran automatismo y postura catatónica caracterizada por la inmovilidad y cese de la conducta exploratoria que viene seguida de clonus facial, movimientos de cabeceo, frecuente rascado unilateral y bilateral de las extremidades anteriores, clonus sostenido de las extremidades posteriores, sacudidas de corporales y caídas e intentos de incorporarse (Friedman et al., 1994; Mouri et al., 2008; Pernot et al., 2011). A diferencia de la actividad mostrada en ratas neonatas, las ratas adultas presentan sacudidas de tipo “perro mojado” así

como salivaciones y exoftalmos que disminuyen conforme aumenta la ocurrencia de las crisis (Ben-Ari et al., 1981; Velisek et al., 1992).

Los efectos neurotóxicos del AK han sido evaluados en diferentes etapas del desarrollo, entre los 10 y 15 días de edad en animales. Seguido a la inyección intraperitoneal con AK hay una pérdida de células piramidales en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo así como en regiones extratemporales. Se ha observado que el daño en las regiones extrahipocampales no es causada por la toxina en sí, si no que depende de la propagación de la actividad epileptiforme (Sperk et al. 1985).

2.6 NEUROINFLAMACIÓN EN LA EPILEPTOGÉNESIS

El sistema inmune y sus reacciones inflamatorias asociadas juegan un importante papel en la protección y reparación de tejidos de una gran variedad de insultos infecciosos y no infecciosos. El sistema inmune se divide en dos partes: una responsable de una inmediata acción contra agentes externos llamado sistema inmune innato y otro que permite el reconocimiento de antígenos por medio de células presentadoras de antígenos (APCs) y receptores para antígenos constituyendo el sistema inmune adaptativo.

La transición entre la inmunidad innata y adaptativa es mediada por una gran variedad de mediadores de inflamación entre los cuales las citosinas y los receptores tipo Toll (TLRs) juegan un papel importante (Becher, 2000)

El sistema nervioso central (SNC) es considerado un sitio inmunoprivilegiado debido a la presencia de la barrera hematoencefálica, ausencia de una circulación linfática convencional y un aparente tráfico bajo de monocitos y linfocitos (Ransohoff, 2003)

La neuroinflamación es una condición caracterizada por la presencia de moléculas (citosinas y mediadores de inflamación establecidos) que no son detectables o poco detectables en condiciones fisiológicas (Vezzani, 2005). Estas moléculas son producidas por células del parénquima cerebral (microglia, astrocitos y neuronas) y por células de la barrera hematoencefálica y el plexo coroideo.

Los TLRs (Figura 2) son una familia de proteínas transmembranales de tipo 1 evolucionariamente conservados entre los insectos y los mamíferos y expresados por las

células del sistema inmune. La estimulación de estos receptores y moléculas coestimuladoras (como CD14) activan una vía de señalización que es un parte compartida por la señalización del receptor IL-1R1 (Interleukin IL-1 receptor type 1). La activación del TLR resulta en la inducción de factores transcripcionales como el NFκB, que tiene la habilidad de activar varios genes proinflamatorios tales como los que codifican para citosinas, quimiosinas, ciclooxigenasa 2 (COX 2) y el óxido nítrico inducible (Rivest, 2003; Laflamme, 2003).

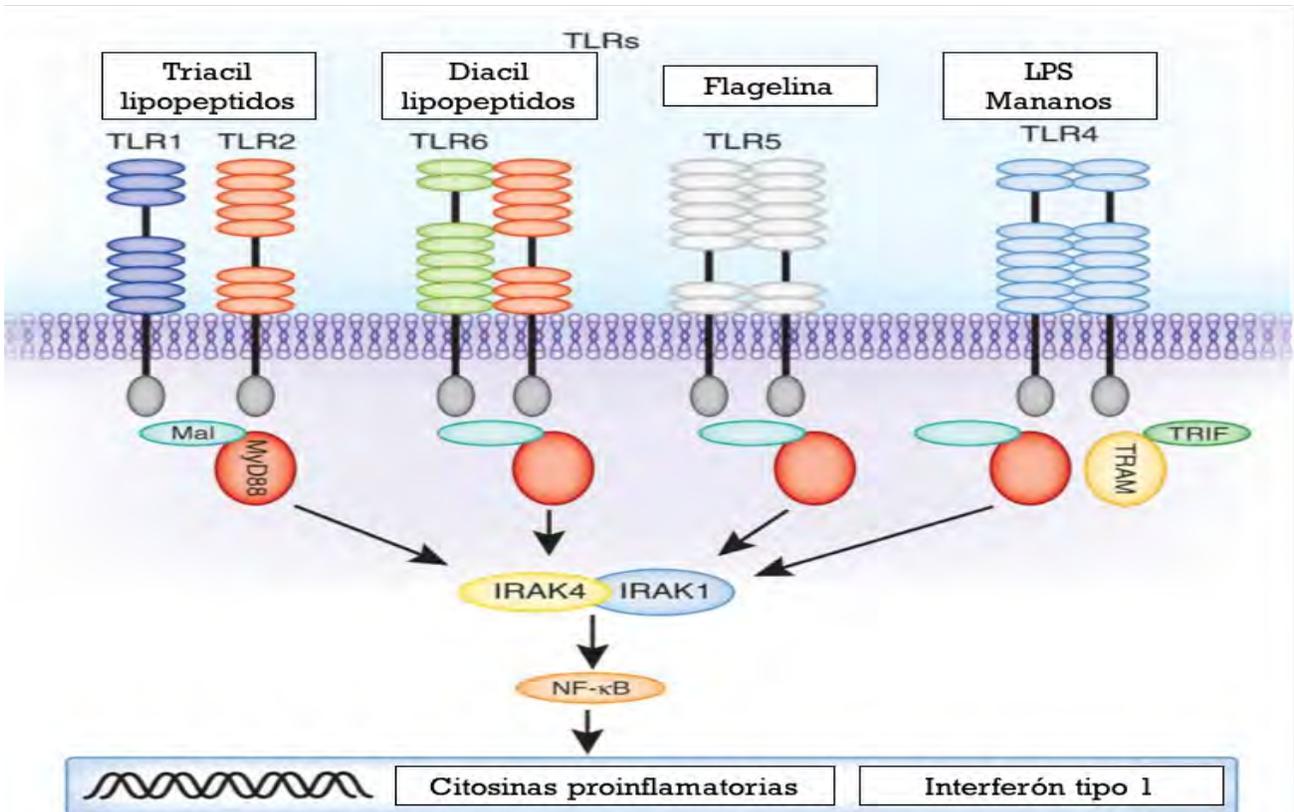


Figura 2. Esquema donde se muestran los diferentes ligandos de los receptores tipo Toll y la principal vía de señalización intracelular que desencadenan. Tomado de Natea et al, 2012.

Una respuesta inmune en el SNC también puede ser activada por ligandos endógenos que estimulan los TLRs (señales de daño celular o moléculas entrantes al cerebro debido a un daño a la barrera hematoencefálica). En este aspecto, es importante notar que el SNC muestra una alta respuesta inflamatoria no solo ante agentes infecciosos sino que también a un amplio espectro de lesiones tales como isquemia, daño cerebral traumático o excitotóxico y durante una crisis. (Allan, 2001; Jankowsky, 2001).

Existen 3 principales vías de señalización proinflamatorias activadas durante los procesos de epileptogénesis: IL-1/TLR, COX-2 y TGF- β (Vezzani, 2013) (Figura 3).

Un evento iniciador con propiedades epileptogénicas (traumatismo craneoencefálico, crisis febriles, estado epiléptico, infecciones, mutación de genes, etc.) puede causar la activación de la microglia, de astrocitos y de neuronas y/o una disfunción de la barrera hematoencefálica en las regiones cerebrales involucradas en el evento patológico.

Las células cebadas liberan citosinas proinflamatorias (IL-1 β) y señales de daño (anfoterina HMGB1) provocando eventos inflamatorios en las células blanco (neuronas y glía) por activación del receptor IL-1/TLR. Esta vía de señalización resulta en un incremento rápido de la conductancia del receptor NMDA mediante la fosforilación de la subunidad NR2B mediada por Src permitiendo el incremento de los niveles de Ca⁺ lo cual deriva en cambios patológicos como hiperexcitabilidad neuronal, disminución del umbral y reorganización de redes neuronales. La activación de la transcripción de genes dependientes de NF κ B mediada por IL-1/TLR (incluyendo COX2) contribuye a la generación de cambios en moleculares y celulares involucrados en la epileptogénesis y perpetúa la neuroinflamación.

La activación de los receptores NMDA promueve la activación de COX2 mediante la vía del óxido nítrico inducible (iNOS) y la producción de ácido araquidónico mediada por la fosfolipasa A₂. La COX2 sintetiza prostaglandinas E (PGE) que activa a los receptores EP1 y EP2 que están acoplados a vías de señalización intracelulares como la movilización del Ca⁺ de almacenamientos intracelulares y síntesis de cAMP, respectivamente que también contribuye a la inflamación.

La disfunción de la barrera hematoencefálica resultante del evento iniciador o de la respuesta inflamatoria (IL-1/TLR, COX2) conlleva una extravasación de albumina en el parénquima cerebral y una subsecuente activación de la señalización de TGF- β en astrocitos. Esta señalización promueve una futura inflamación por genes dependientes de NF κ B y una disfunción astrocítica (disminución de Kir4.1 [subunidad de los canales de potasio] y detransportadores de glutamato). Esta cadena de eventos concomitantes genera una hiperexcitabilidad neuronal, daño celular y una reorganización de las redes neuronales que son responsables del origen de convulsiones y posteriormente el desarrollo de la epilepsia.

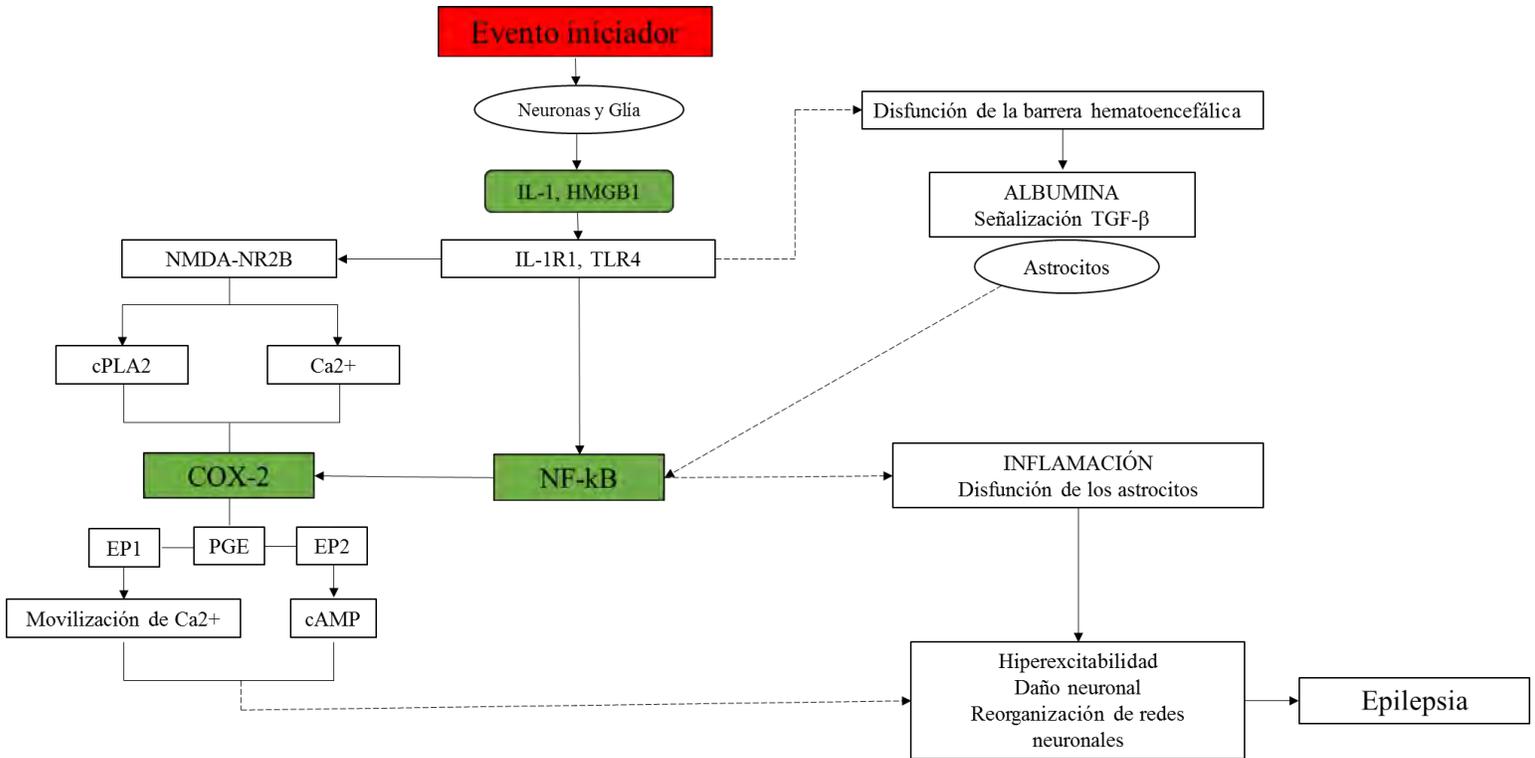


Figura 3. Diagrama de la cascada fisiopatológica mediada por las tres vías clave proinflamatorias activadas en la epilepsia: IL-1/TLR, COX-2 y TGF-β. En verde se encuentran los puntos clave de inflamación presentes durante la epileptogénesis. Modificado de Vezzani et al, 2013.

2.6.1 IL-1β (INTERLEUCINA 1β)

La interleucina 1β (Figura 4) es una citosina proinflamatoria de 269 aminoácidos activada proteolíticamente por la caspasa 1 (CASP1/ICE) y expresada por varias células incluyendo los macrófagos, las células NK, monocitos y neutrófilos. (Nicklin, 1994)

En procesos de neuroinflamación, la IL-1β reduce la inhibición mediada por GABA en el área CA3 del hipocampo mediante cinasas aún no identificadas (Wang et al., 2000; Zeise et. Al., 1997) e incrementa la excitabilidad neuronal del área CA1 mediante la reducción de canales NMDA y canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje de



Figura 4. Estructura cristalográfica de la interleucina 1β. Tomada de Griffin et al, 2002.

corriente externa debida a una fosforilación de canales de Ca^{2+} de larga conductancia dependientes de K^+ (Zhang et al., 2011). Se ha observado en neuronas de hipocampo cultivadas también potencia la función del receptor NMDA usando mecanismos no transcripcionales como el aumento del flujo de Ca^{2+} mediante la activación de la cinasa Src dependiente de la fosforilación de NR2B (Viviani et al., 2003).

Después de la liberación de IL-1 β y HMGB1 contribuyen a la ocurrencia de la primera convulsión, la síntesis *de novo* de ambas moléculas es activada en la microglía y astrocitos (De Simoni et al, 2000; Maroso et al., 2010). Altos niveles de expresión de estas moléculas proinflamatorias en el cerebro desencadenan cambios transcripcionales mediados por NF κ B y AP-1 que pueden perpetuar la inflamación en el tejido por medio de la inducción de genes de inflamación (Gorter et al, 2006). Esta segunda onda de inflamación y una subsecuente liberación de moléculas proninflamatorias pueden contribuir a la recurrencia de las crisis convulsivas; de hecho, el bloqueo específico de la señalización IL-1R/TLR en neuronas y glía reduce la frecuencia de convulsiones agudas y crónicas y atenúa el nivel de inflamación concomitante del cerebro (Maroso et al., 2011; Ravizza et al., 2005; Vezzani et al., 2013).

2.6.2 NFKB (NUCLEAR FACTOR KB)

El NF- κ B es un factor de transcripción que forma parte de la familia Rel, constituida por cinco proteínas que contienen dominios homólogos y que forman entre ellas homodímeros o heterodímeros. Estas proteínas son: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel y RelB; de éstas sólo las tres últimas tienen el dominio transactivador, indispensable para reconocer el promotor de los genes diana (Tabla 1) (Beinke, 2004)

La formación del homodímero o heterodímero es determinante en la actividad transcripcional en los promotores de los genes diana. El heterodímero p50/p65 es el más común y su actividad transcripcional ocurre gracias a la proteína p65 (Hayden et al., 2004). Aunque los homodímeros p50 y p52 no poseen actividad transcripcional, pueden estimular la transcripción cuando se unen a la proteína nuclear parecida al inhibidor de κ B (BCL-3) (Fujita et al., 1993).

Tabla 1. Genes diana del NF κ B. Tomada de Echeverr  et al, 2008.

Citocinas/factores de crecimiento
Interleucina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , linfotoxina, interferón- β , factor estimulador de colonias de granulocitos, factor estimulador de colonias de macrófagos, factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos.
Receptores solubles de citocinas
Cadena α del receptor de IL-2
Proteínas de estrés
Proteína de suero amiloide A, factor de complemento B, α -1 glicoproteína acida C3 y C4, enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (Cat), glutatión (GSH), la cadena pesada de ferritina (FHC).
Moléculas de adhesión
Molécula de adhesión intracelular 1, molécula de adhesión celular vascular 1, selectina E.
Moléculas inmunoreguladoras
Cadena ϵ ligera de inmunoglobulinas, complejo mayor de histocompatibilidad, receptor de células T (α y β), microglobulina β_2 , cadena invariante, transportador asociado con en antígeno procesador, subunidad del proteosoma (LMP2), �xido nítrico sintetasa inducida, inhibidoras de Θ B, p53, A20.

Las proteínas p50 y p52 se sintetizan como precursores p105 y p100 respectivamente, procesados por el proteosoma, donde se remueve su extremo carboxilo-terminal, dando lugar a las formas activas p50 y p52 (Farrow et al., 2002)

La ruta clásica de activación de NF κ B es inducida por una variedad de mediadores de la respuesta inmune innata y adaptativa, tales como citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β) la activación del receptor TLR y los receptores de antígenos (TCR y BCR). Todas estas cascadas de se nalizaci n convergen en la activación de las proteínas IKK y en la degradación de I κ B α permitiendo la liberación de los heterodímeros p50/RelA y p50/c-Rel (Gloire et al., 2006).

En la vía de activación clásica el evento característico es la fosforilación de I κ B α por el complejo IKK α /p (Pomerantz et al, 2002). En esta ruta también interviene NEMO, el cual es requerido para la interacción del complejo IKK con las proteínas corriente arriba de la se nal (Karin et al, 2000). En respuesta a la activación por TNF α e IL-1, IKK β fosforila a I κ B α . La activación de IKK β por estos estímulos requiere de la proteína activadora de mitosis cinasa-cinasa (MAP-3K), MAPK/ERK-cinasa reguladora de se nales extracelulares (MEKK3) y cinasa activadora del factor de crecimiento transformante p (TAK1) las cuales probablemente fosforilan directamente a IKK β (Takaesu et al, 2003).

Todos estos inductores de NF- κ B, a través de diferentes receptores y proteínas adaptadoras, desencadenan señales que convergen en la activación del complejo cinasa I κ B (IKK), complejo que incluye a la molécula de andamiaje NEMO y a las IKK α e IKK β (Zandi et al, 1997).

La I κ B α es fosforilada por IKK β en el extremo N-terminal en residuos de serina, lo que permite la unión de I κ B a con la proteína que contiene repeticiones de transducción p (pTrCP), la cual forma parte del complejo de ligasa de ubiquitina Skp1/Cul1/F-box (SCF) (Liu, 2004). Éste cataliza la rápida poliubiquitinación de I κ B α para su degradación por el proteosoma 26S, permitiendo la liberación de NF κ B y la consiguiente modulación de transcripción de genes como el gen de la COX-2 (Bonizzi et al, 2004).

2.6.3 COX-2 (CICLOOXIGENASA 2)

El gen de la ciclooxygenasa 2 (Figura 5) se encuentra en el cromosoma 1, mide aproximadamente 8.3 kb y contiene 10 exones. Su región promotora tiene lugares de ligadura que se sabe que reconocen a los glucocorticoides, a la IL-6 y a otras citosinas (Hla et al, 1992). En la célula, la COX-2 se encuentra fundamentalmente en la región perinuclear y en la membrana nuclear (Crofford et al, 1997) y es la enzima responsable de la síntesis de prostaglandinas utilizando el ácido araquidónico como sustrato (Smith et al, 1996).



Figura 5. Estructura cristalográfica de la enzima COX2. Tomada de Kurumbail et al, 1997.

La COX-2 es constitutivamente expresada en bajos niveles en los somas y espinas dendríticas de las neuronas hipocampales. Es regulada por actividad sináptica y es marcadamente inducida en las neuronas dentro de horas después de una crisis convulsiva o un estado epiléptico, involucrando la actividad de los receptores NMDA. (Marcheselli et al., 1996; Takemiya et al, 2006; Polascheck et al, 2010).

La síntesis de prostaglandinas mediadas por COX-2 conlleva la producción de radicales libres como productos intermediarios, que pueden potenciar los efectos mediados por

glutamato. La producción de PGE2 de astrocitos activado por TNF- α puede mediar la liberación astrocítica de glutamato dependiente de Ca²⁺, contribuyendo a la actividad ictal y a la excitotoxicidad. (Polascheck et al, 2010)

2.7 ANTIEPILEPTOGÉNESIS

La antiepileptogenesis es un proceso que contrarresta los efectos de la epileptogenesis, incluyendo la prevención, modificación de las crisis y la cura.

- a) Prevención: Una prevención completa detiene el desarrollo de la epilepsia. Una prevención parcial puede retardar el desarrollo de la epilepsia o reducir su severidad. Por ejemplo, las crisis ocurren pero pueden ser en menor frecuencia, más cortas o de tipo menos severo (modificación de la crisis). La antiepileptogenesis también puede prevenir o reducir la progresión de la epilepsia después de que esta ya haya sido establecida.
- b) Cura: El control de la epilepsia. No ocurren crisis convulsivas después de retirar el tratamiento (Pitkänen, 2010).

2.7.1 TRATAMIENTOS ANTIEPILEPTOGÉNICOS

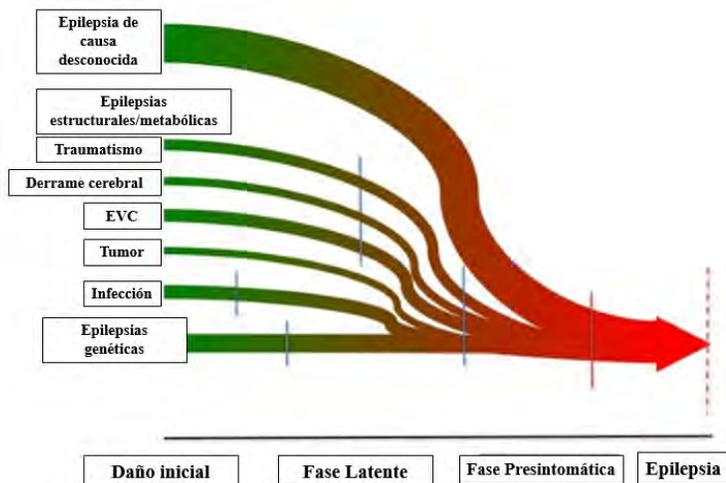


Figura 6. Esquema que muestra la fase exacta según la etiología de la epilepsia, donde puede administrarse un tratamiento antiepileptogénico para obtener óptimos resultados. Modificado de French et al, 2013.

Un tratamiento antiepileptogénico es aquel que detiene el proceso de epileptogenesis para evitar que la epilepsia se establezca. Estos tratamientos puede tener diferentes efectos dependiendo la etiología y la fase en la que se administre (Figura 6). Muchos investigadores han tratado de descubrir un nuevo fármaco capaz de evitar este proceso con éxito.

2.7.2 DAPSONA

La 4,4'-diamino-difenil-sulfona (DDS) es una anilina derivada pertenecientes al grupo de las sulfonas sintéticas (Wozel, 2014). Fue por primera vez sintetizada en 1908 pero fue hasta 1937 que se descubrieron sus propiedades antimicrobianas. Poco después, mediante el uso de la dapsona para enfermedades no patógenas reveló mecanismos antiinflamatorios alternos similares a los que presentan los antiinflamatorios no esteroideos que inicialmente fueron elucidados por modelos animales. Actualmente se utiliza como quimioterapia para la lepra, contra infecciones de *Pneumocystis carinii*, coadyuvante de terapias contra varias enfermedades de la piel y recientemente se han reportados efectos anticonvulsivantes y neuroprotectores en modelos animales (Díaz-Ruiz, 2013)

Como sulfona, la dapsona presenta en su estructura un átomo de azufre unido a dos átomos de oxígeno (Figura 7). Su solubilidad varía dependiendo el disolvente usado (agua 0.2 mg/mL, metanol 52 mg/mL). Después de una administración oral, la dapsona es completamente absorbida por el intestino con una biodisponibilidad de aproximadamente 86%. Los picos de concentración en suero son alcanzados entre 2 y 8 horas después de la administración alcanzando valores de 0.63 a 4.82 mg/L. (Zuidema et al, 1986)

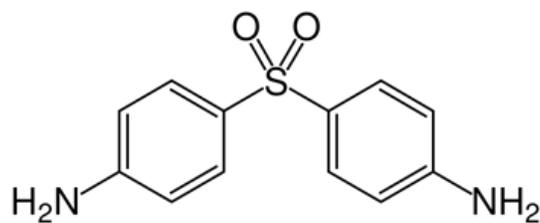


Figura 7. Estructura química de la 4,4'-diamino-difenil-sulfona (DDS)

Después de la absorción, la dapsona realiza circulación enterohepática y es metabolizada por el hígado pero también por leucocitos morfonucleares activados (PMN) y células mononucleares. En el hígado, es metabolizada primariamente a través de acetilación por la N-acetiltransferasa a monoacetildapsona (MADDS) y a través de hidroxilación por enzimas del citocromo P450 resultando en la generación de dapsona hidroxilamina (DDS-NOH) (Utrecht et al, 1988)

Estudios recientes han reportado sobre sus efectos anticonvulsivantes y neuroprotectores. La administración de una dosis de 12.5 mg/kg después de la administración de ácido kaínico fue capaz de disminuir las crisis tónico-clónicas hasta en un 50% y la mortalidad hasta en un 75%. También disminuyó la pérdida neuronal en el área CA3 del hipocampo (Díaz-Ruiz, 2013).

Los posibles mecanismos antiinflamatorios y neuroprotectores propuestos es recientes estudios son:

- a) Mecanismos similares a la zonisamida (ya que la dapsona posee una estructura similar) que tiene la habilidad de bloquear canales de Ca^{2+} en las neuronas lo cual conlleva un efecto sobre la excitotoxicidad provocada por el daño inicial (Figura 8) (Altagracia, 1994; Díaz, 2013).

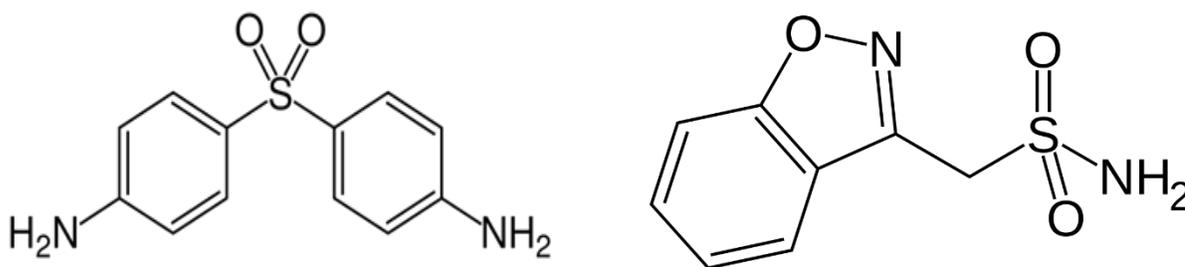


Figura 8. Estructura química de la dapsona (izquierda) y de la zonisamida (derecha). Se observa su similitud ya que ambos poseen el grupo sulfona.

- b) Regulación en la síntesis de prostaglandinas (específicamente antes de la conversión de prostaglandina H2 a prostaglandina D2) lo cual se involucraría en la regulación de la COX2 (Wozel, 2014).

2.7.3 EXTRACTO DE *Aristotelia chilensis* (MAQUI BERRY)



Figura 9. Frutos maduros de la planta Aristotelia chilensis.

Las moras constituyen una fuente rica en antioxidantes fenólicos y propiedades bioactivas (Smith et al., 2000). Las moras chilenas de la planta *Aristotelia chilensis* (comúnmente denominada Maqui berry) que alcanzan su madurez entre los meses

de Diciembre y Marzo, tienen un alto consumo durante estos meses en la parte central y sur de Chile y el oeste de Argentina (Céspedes et al, 2010). Esta planta ha tenido popularidad en la etnomedicina por muchos años y usado particularmente como agente antiinflamatorio, dolores de riñones, úlceras estomacales, diversos malestares intestinales, fiebre y cicatrizante de heridas. (Bhakuni, 1976).

Estudios recientes reportan que el jugo (extracto acuoso) de los frutos de *Aristotelia chilensis* tiene fuerte actividad antioxidante (Pool-Zobel et al, 1999) y actividad regulatoria de la COX-2 mediante la inhibición del NFκB y la regulación de la vía de la cinasa PI3/Akt (Ojeda et al, 2011). Dichas propiedades se ha atribuido a la altas concentraciones de antocianinas presentes en los extractos de Maqui berry.

Un análisis de HPLC realizado a extracto concentrado de Maqui berry reveló que dicho extracto posee una concentración de antocianinas del 0.5423% / 100g de frutos secos. El análisis también mostró las antocianinas presentes en el extracto:

- 0.1359% Delfinidina 3-*O*-sambubiosido-5-*o*-glucosido.
- 0.1297% Cianidina 3-*O*-sambubiosido-5-*o*-glucosido.
- 0.1112% Delfinidina 3,5-*o*-diglucosido.
- 0.0735% Delfinidina 3-*o*-glucosido.
- 0.0516% Delfinidina 3-*O*-sambubiosido.
- 0.0271% Cianidina 3-*O*-sambubiosido.
- 0.0115% Cianidina 3-*o*-glucosido.

El mecanismo de acción antiinflamatorio propuesto ocurre mediante una disminución en la fosforilación de Akt y ERK 1/2 que ocasiona una disminución en la degradación de IκBα, que participa en la activación del NFκB. Dicha señalización puede regular la activación del NFκB y por consiguiente regular la expresión de COX-2 (Ojeda, 2011).

3. JUSTIFICACIÓN

El status epilepticus ocurre con mayor prevalencia en edades tempranas y es una de las causas que desencadena el proceso de epileptogénesis (Engel, 2001), proceso en el cual participan proteínas proinflamatorias (IL-1 β , COX-2) en el origen de crisis convulsivas espontáneas (Lukasiuk, 2009). Por ello, es de suma importancia encontrar un mecanismo eficaz que detenga el proceso de epileptogénesis una vez ocurrido un status epilepticus y por consiguiente evitar la aparición de crisis convulsivas espontáneas en edades tardías.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿La administración de Dapsona y el extracto de Maqui berry evitará el proceso de epileptogénesis a través de la reducción de proteínas proinflamatorias IL-1 β y COX2 y el factor de transcripción NF κ B y el desarrollo de crisis convulsivas en edades tardías?

5. HIPOTESIS

El extracto de *Aristotelia chilensis* (Maqui berry) y la dapsona disminuirán la expresión de las proteínas proinflamatorias (IL-1 β , COX2) y el factor de transcripción NF κ B y por consiguiente la aparición de crisis convulsivas espontáneas.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

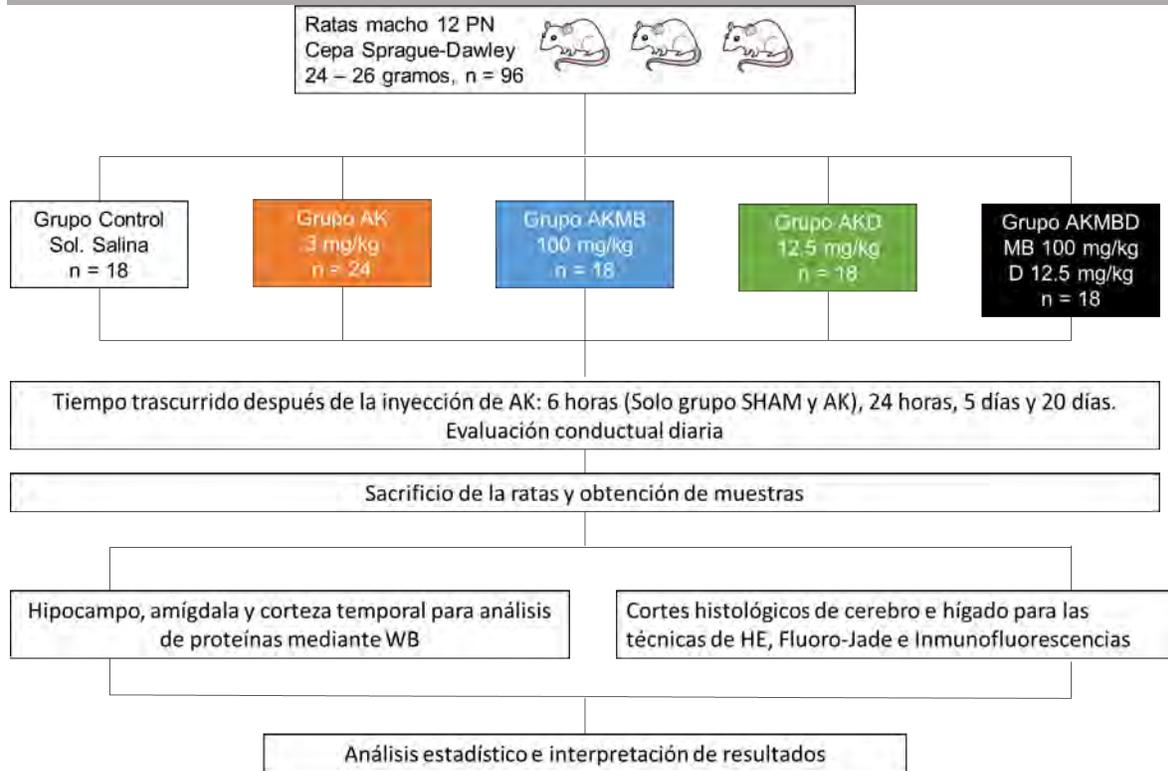
Evaluar el efecto neuroprotector, antiinflamatorio y anticonvulsivante a corto y largo del extracto de *Aristotelia chilensis* (Maqui berry) y dapsona sobre la epileptogénesis asociada al daño producido por el status epilepticus inducido con ácido kaínico en ratas neonatas.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Monitorear el peso de las ratas desde el primer día de tratamiento hasta la finalización del mismo (17 y 32 días PN)
- b) Evaluar la conductora motora resultante de la actividad convulsiva inducida por ácido kaínico al día 12 PN.
- c) Evaluar la evolución de la conducta motora producida por la actividad convulsiva espontánea mediante el cálculo de la frecuencia convulsiva por fase.
- d) Verificar la existencia de un daño hepático causado por los tratamientos mediante la técnica de HE en cortes histológicos de hígado.
- e) Evaluar la neurodegeneración en cortes histológicos de cerebro mediante la técnica de Fluoro-Jade al día 17 y 32 PN.
- f) Cuantificar los niveles de expresión de las proteínas IL-1 β , COX2 y el factor de transcripción NFkB en tejidos de hipocampo, amígdala y corteza temporal mediante la técnica de Western Blot.
- g) Verificar la expresión de las proteínas IL-1 β , COX2 y el factor de transcripción de NFkB en cortes histológicos de cerebro mediante inmunofluorescencia.

7. MÉTODOS

7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL



7.2 UNIVERSO DE ESTUDIO

Ratas de la cepa Sprague Dawley.

7.2.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Ratas macho de la cepa Sprague Dawley.
- Ratas sanas de 12 días de edad con un peso que varíe entre los 24 y 26 gramos.

7.2.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Ratas que no posean el peso requerido al inicio del experimento.
- Ratas que no alcancen el status epilepticus con la dosis propuesta de ácido kaínico.

7.2.4 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- a) Ratas que mueran durante o después del status epilepticus inducido con ácido kaínico.
- b) Ratas que no desarrollen crisis convulsivas espontáneas recurrentes después del status epilepticus.

7.2.5 VARIABLES INDEPENDIENTES

- a) Ácido kaínico
- b) Extracto de *Aristotelia chilensis* (Maqui berry)
- c) Dapsona

7.2.6 VARIABLES DEPENDIENTES

- a) Actividad convulsiva generada por el ácido kaínico.
- b) Número de células en degeneración
- c) Concentración y localización de las proteínas COX-2, IL-1 β y NF κ B.

7.3 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Ratas machos de la cepa Sprague Dawley, de 12 días de edad, cuyo peso osciló entre los 24 y 26 gramos se les proporcionó alimento y agua *ad libitum* (Alimento materno hasta que cumplieran los 21 días de edad y después fueron alimentados con Formulab Diet #5008). Mantuvieron un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y temperatura regulada de 20 a 22 °C.

Se empleó una n = 96, divididos en 5 grupos y cada grupo fue dividido en 3 subgrupos de 6 ratas cada uno.

7.3.1 GRUPO CONTROL (C)

Ratas inyectadas con solución salina vía intraperitoneal con un volumen de 50 μ L al día 12 postnatal.

- a) Subgrupo 6 h: Sacrificio de las ratas 6 horas después de la inyección de solución salina.
- b) Subgrupo 24h: Sacrificio de las ratas 24 horas después de la inyección de solución salina.
- c) Subgrupo 5 días: Desde el día 12 postnatal hasta el día 17 postnatal administrando un volumen diario de 50 μ L de solución salina por vía oral. Sacrificio de las ratas al día 17 postnatal.
- d) Subgrupo 20 días: Desde el día 12 postnatal hasta el día 32 postnatal administrando un volumen diario de 50 μ L de solución salina por vía oral. Sacrificio de las ratas al día 32 postnatal.

7.3.2 GRUPO CONTROL DE ÁCIDO KAÍNICO (AK)

Ratas inyectadas vía intraperitoneal de ácido kaínico (3 mg/kg) que causa un status epilepticus (Ravizza, 2005) al día 12 postnatal.

- a) Subgrupo 6 h: Sacrificio de las ratas 6 horas después de la inyección de ácido kaínico.
- b) Subgrupo 24h: Sacrificio de las ratas 24 horas después de la inyección de ácido kaínico.
- c) Subgrupo 5 días: Desde el día 12 postnatal hasta el día 17 postnatal administrando un volumen diario de 50 μ L de solución salina por vía oral. Sacrificio de las ratas al día 17 postnatal.
- d) Subgrupo 20 días: Desde el día 12 postnatal hasta el día 32 postnatal administrando un volumen diario de 50 μ L de solución salina por vía oral. Sacrificio de las ratas al día 32 postnatal.

7.3.3 GRUPO ÁCIDO KAÍNICO + MAQUI BERRY (AKMB)

Ratas inyectadas vía intraperitoneal de ácido kaínico (3 mg/kg) que causa un status epilepticus (Ravizza, 2005) al día 12 postnatal.

- a) Subgrupo 24h: Sacrificio de las ratas 24 horas después de la inyección de ácido kaínico.
- b) Subgrupo 5 días: Desde el día 12 postnatal hasta el día 17 postnatal administrando una dosis diaria del extracto Maqui berry de 100 mg/kg. Sacrificio de las ratas al día 17 postnatal.
- c) Subgrupo 20 días: Desde el día 12 postnatal hasta el día 32 postnatal administrando una dosis diaria del extracto Maqui berry de 100 mg/kg. Sacrificio de las ratas al día 32 postnatal.

7.3.4 GRUPO ÁCIDO KAÍNICO + DAPSONA (AKD)

Ratas inyectadas vía intraperitoneal de ácido kaínico (3 mg/kg) que causa un status epilepticus (Ravizza, 2005) al día 12 postnatal.

- a) Subgrupo 24h: Sacrificio de las ratas 24 horas después de la inyección de ácido kaínico.
- b) Subgrupo 5 días: Desde el día 12 postnatal hasta el día 17 postnatal administrando una dosis diaria de Dapsona de 12.5 mg/kg. Sacrificio de las ratas al día 17 postnatal.
- c) Subgrupo 20 días: Desde el día 12 postnatal hasta el día 32 postnatal administrando una dosis diaria de Dapsona de 12.5 mg/kg. Sacrificio de las ratas al día 32 postnatal.

7.3.5 GRUPO ÁCIDO KAÍNICO + MAQUI BERRY + DAPSONA (AKMBD)

Ratas inyectadas vía intraperitoneal de ácido kaínico (3 mg/kg) que causa un status epilepticus (Ravizza, 2005) al día 12 postnatal.

- a) Subgrupo 24h: Sacrificio de las ratas 24 horas después de la inyección de ácido kaínico.

- b) Subgrupo 5 días: Desde el día 12 postnatal hasta el día 17 postnatal administrando una dosis diaria del extracto de Maqui berry de 100 mg/kg y de Dapsona de 12.5 mg/kg. Sacrificio de las ratas al día 17 postnatal.
- c) Subgrupo 20 días: Desde el día 12 postnatal hasta el día 32 postnatal administrando una dosis diaria del extracto de Maqui berry de 100 mg/kg y de Dapsona de 12.5 mg/kg. Sacrificio de las ratas al día 32 postnatal.

7.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente trabajo se realizó dentro de los parámetros establecidos de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999 que incluye especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Para la administración de los tratamientos se utilizaron micropipetas de 100 µL, lo cual minimizó el daño producido por una sonda gástrica y asegurando que los tratamientos fueran ingeridos en su totalidad.

Para el sacrificio se utilizó la decapitación debido a que es un método físico rápido y práctico donde el sufrimiento del animal es mínimo debido a que la muerte es instantánea. Además este método es adecuado para el estudio dado que los anestésicos interfieren en el análisis.

Se empleó un mínimo número de animales tomando en cuenta las técnicas a realizar y los requerimientos estadísticos para el análisis final.

Se cumplió con las condiciones adecuadas del bioterio en cuanto a la ventilación, área de mantenimiento de animales, jaulas, alimentación, ciclos de luz/oscuridad, higiene y cuidado de los animales por medio del personal del bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

7.5 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD CONVULSIVA

El primer análisis de la actividad convulsiva fue durante la aplicación de la inyección de ácido kaínico y hasta 1 hora y media después. La evaluación fue llevada a cabo utilizando la escala siguiente propuesta por Raol et al., 2009:

- **FASE I:** Cesa la conducta exploratoria, la rata permanece inmóvil.
- **FASE II:** Presenta sacudidas corporales y sobresaltos.

- **FASE III:** Presenta rascados recurrentes con las extremidades inferiores (mioclonías unilaterales)
- **FASE IV:** Presenta rascados recurrentes con las extremidades inferiores y superiores (mioclonías bilaterales)
- **FASE V:** Pérdida de la postura e intentos de incorporarse sin éxito. Los rascados se presentan más frecuentes y entre cada uno de ellos hay una separación menor a 1 minuto (Pérdida del periodo interictal). Estado epiléptico establecido.

Una vez que la rata hubo alcanzado la fase V (aproximadamente 40 minutos después de la inyección), se dejó durante otros 30 a 40 minutos más en esa fase. Cumpliendo ese tiempo se administró una dosis de 5 mg/kg de Valium® (Diazepam) vía intramuscular para detener las crisis convulsivas.

El segundo análisis de la actividad convulsiva se realizó al día siguiente después de la inyección de ácido kaínico y hasta los cortes de tiempo ya establecidos (5 días y 20 días).

Dicha evaluación se realizó diariamente con una duración de 2 horas anotando el número de convulsiones que presentaba cada animal y el tipo de las mismas.

7.6 WESTERN BLOT

7.6.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Los animales fueron sacrificados por decapitación y se obtuvo el cerebro por craneotomía disecando el hipocampo, la amígdala y la corteza temporal. Dichos tejidos fueron puestos en tubos eppendorf de 1.5 mL junto con buffer de lisis más inhibidores de proteasas.

Se realizó una maceración del tejido en hielo para conservar las proteínas para después ser centrifugado a 14000 rpm a 4 °C. Posteriormente se obtuvo el sobrenadante y se realizó la cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford, con lo cual se determinó la cantidad de proteína a utilizar en la electroforesis.

Para dicho método se realizó una curva de calibración con albúmina preparando soluciones a diferentes concentraciones ya conocidas y se midió la densidad óptica a 590 nm en un espectrofotómetro. Con los resultados obtenidos se realizó una regresión lineal obteniendo un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.98. Utilizando esta gráfica se interpolaron las concentraciones de proteínas de los tejidos.

7.6.2 ELECTROFORESIS

Se determinó la cantidad de 60 mg de proteína por muestra para cargar en los pozos del gel de electroforesis adicionando el buffer de carga (Buffer de carga Laemmli de Biorad y β -mercaptoetanol). Posteriormente las muestras se desnaturalizaron sumergiéndolas en agua hirviendo durante 5 minutos; la desnaturalización junto con el buffer de carga les confiere a las proteínas carga negativa y una pérdida de su estructura tridimensional.

La electroforesis se llevó a cabo en geles de bis-acrilamida al 10% y al 12% dependiendo de la proteína a caracterizar (10% para COX2 y NFkB, 12% para IL-1 β). Dichos geles fueron corridos a 80 volts durante aproximadamente 3 horas.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF a 18 volts y posteriormente se bloquearon las uniones inespecíficas con leche Svelty [®] baja en grasas disuelta en PBS-T (buffer de fosfatos + Tween[®]) a una concentración del 10%, durante dos horas. Al finalizar ese tiempo se realizaron dos lavados a las membranas con PBS-T + ALB (buffer de fosfatos + Tween [®] + albumina al 0.2%).

7.6.3 INCUBACIÓN Y ANÁLISIS

Después del bloqueo se incubaron las membranas con los anticuerpos correspondientes (COX2, IL-1 β , NFkB y GAPDH como proteína control) diluidos en PBS-T + ALB (buffer de fosfatos + Tween [®] + albumina al 0.02%). Las concentraciones dependieron del tejido a analizar: para hipocampo 1.5 μ L de anticuerpo + 1.5 μ L de PBS-T + ALB, para amígdala 2 μ L de anticuerpo + 1.5 μ L de PBS-T + ALB y para corteza temporal 1 μ L de anticuerpo + 1.5 μ L de PBS-T + ALB. La incubación con el anticuerpo primario duró 24 horas.

Pasada la incubación del anticuerpo primario se realizaron tres lavados con PBS-T de 5 minutos cada uno. Después se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario contra la especie correspondiente a cada anticuerpo primario; dicha incubación duró 1 hora.

Pasada la incubación del anticuerpo secundario se realizaron tres lavados con PBS-T y tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Posterior a esto, las membranas se revelaron mediante quimioluminiscencia.

Las placas reveladas fueron analizadas mediante densitometría con el software ImageJ® y los valores densitométricos fueron normalizados dividiendo los valores de las proteínas problema entre los valores de la proteína control.

7.7 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Los animales fueron sacrificados por decapitación y el encéfalo se obtuvo por craneotomía sumergiéndolo en una solución de paraformaldehído al 4% durante 7 días. Pasado ese tiempo se cortó la parte frontal y el cerebelo quedando la parte media del encéfalo.

Posteriormente se procesaron en etanol 70%, etanol 96%, etanol absoluto, xilol y finalmente en parafina. Por último se incluyeron en cubos de parafina para cortarlos en el micrótopo.

7.7.1 TINCIÓN DE FLUORO-JADE

El fluoro-jade es un fluorocromo derivado de la fluoresceína que se utiliza para identificar la neurodegeneración en el sistema nervioso. La tinción se realizó en cortes de parafina del mismo espesor, los cuales después de desparafinarlos y rehidratarlos se sumergieron en alcohol básico (20 mL de hidróxido de sodio al 5% en 80 mL de etanol absoluto) durante 5 minutos. Después se colocaron en etanol al 70% y agua destilada durante 2 minutos en cada solución. Posteriormente se pasaron a una solución de permanganato de potasio al 0.06% durante 20 minutos colocándose en un vaso coplin con agitación suave sobre una plataforma giratoria. Transcurrido este tiempo se realizó la tinción Fluoro-Jade (0.0001% Molecular Probes) durante 24 horas. La solución de Fluoro-Jade al 0.0001 % se preparó mediante la adición de 80 µL de la solución madre de Fluoro-Jade (0.01 %) en 2 mL de ácido acético. Después de la tinción, las laminillas se lavaron con agua destilada y se montaron con resina sintética. Las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia evaluando el daño en hipocampo.

7.7.2 INMUNOFUORESCENCIAS

Las inmunofluorescencias se hicieron en cortes de parafina del mismo grosor, los cuales después de desparafinarlos y rehidratarlos se sumergieron en buffer de citratos (9 mL de ácido cítrico 0.1M + 41 mL de citrato de sodio 0.1M + 950 mL de agua destilada, pH 6) y calentados en el microondas en intervalos de 10 segundos hasta conseguir un burbujeo constante evitando el derrame del buffer. Posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente y en agitación durante 20 minutos, pasado ese tiempo se realizó el bloqueo al tejido utilizando suero normal bovino (5 mL de suero + 1 mL de PBS) durante 30 minutos. Después del bloqueo, se incubaron los anticuerpos primarios para COX 2, NFκB e IL-1 (10 mL de anticuerpo + 1.5 mL de PBS) durante 24 horas. Al día siguiente se realizaron dos lavados con PBS de 5 minutos cada uno y se incubaron los fluorocromos correspondientes para cada anticuerpo (5 mL de Alexa® + 1 mL de PBS) durante 3 horas.

Pasada la incubación se contrataron los núcleos con yoduro de propidio (1 μL de yoduro concentrado + 5 mL de PBS) durante 1 minuto. Posteriormente se realizó un lavado con PBS de 10 minutos y se montaron con medio de montaje Vectashield® sellándolas con barniz transparente.

7.7.3 HEMATOXILINA Y EOSINA

La tinción se realizó en cortes de parafina del mismo grosor que después de desparafinarlos y rehidratarlos se sumergieron en hematoxilina de Harris durante 5 minutos y después se realizaron los siguientes baños haciendo enjuagues con agua destilada entre cada baño:

- Alcohol ácido
- Cloruro de litio
- Eosina

Posteriormente se deshidrataron nuevamente y por último se montaron con resina sintética.

7.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó estadística descriptiva para obtener medidas de dispersión (error estándar) y de tendencia central (promedio) para posteriormente representarlas, en las escalas

correspondientes, con cuadros y gráficas para su fácil ordenamiento, visualización y análisis. Los resultados de los grupos experimentales se sometieron a pruebas de normalidad y varianzas iguales. Posteriormente se realizaron pruebas ANOVA y para encontrar las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se utilizó la prueba *post hoc* Tukey. En el caso del Western Blot donde sólo hubo dos grupos experimentales se utilizó la prueba t de Student con datos no pareados. Para todas las pruebas se consideró un intervalo de confianza del 95 % y un error $\alpha = 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 EFECTOS COLATERALES DE LOS TRATAMIENTOS

Se evaluó el aumento de peso al día 32 PN de los todos los grupos para verificar si algunos de los tratamientos tiene algún efecto sobre el peso del animal. El grupo C presentó una media de 123.66 ± 3.73 g, para el grupo AK 103.5 ± 1.83 g, para el grupo AKMB 105.16 ± 3.01 g, para el grupo AKD 102.16 ± 3.36 g y para el grupo AKMBD 101 ± 3.03 g.

El análisis estadístico mostró una diferencia significativa entre el grupo C y todos los demás grupos experimentales ($p = 0.0089$) (Figura 10).

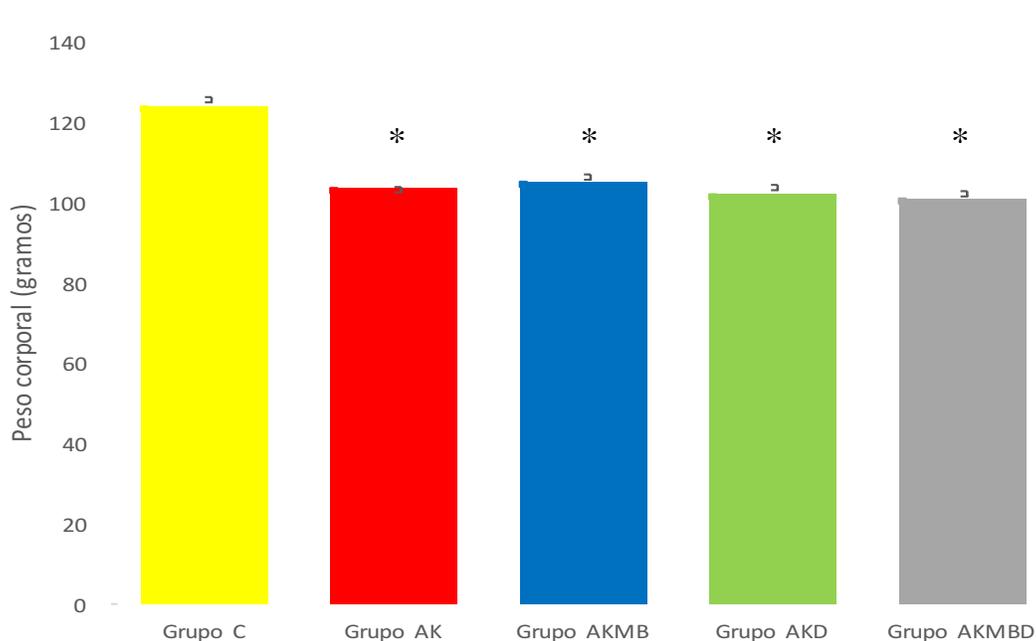


Figura 10. Media del peso en gramos a los 32 días PN. Evaluación realizada en 4 subgrupos de ratas de la cepa Sprague Dawley ($n = 6$ por subgrupo). ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* Tukey ($\alpha = 0.05$). * Diferencia significativa entre el grupo C y todos los demás grupos experimentales ($p < 0.01$)

Debido a no hay alguna diferencia significativa entre el grupo AK y los grupos AKMB, AKD y AKMBD, la disminución en el peso se debe al modelo de ácido kaínico y no a los tratamientos.

Al analizar el aumento de peso a través del tratamiento se observa que las diferencias entre el grupo C y los demás grupos experimentales se dan a partir del día 19 PN. (Figura 11)

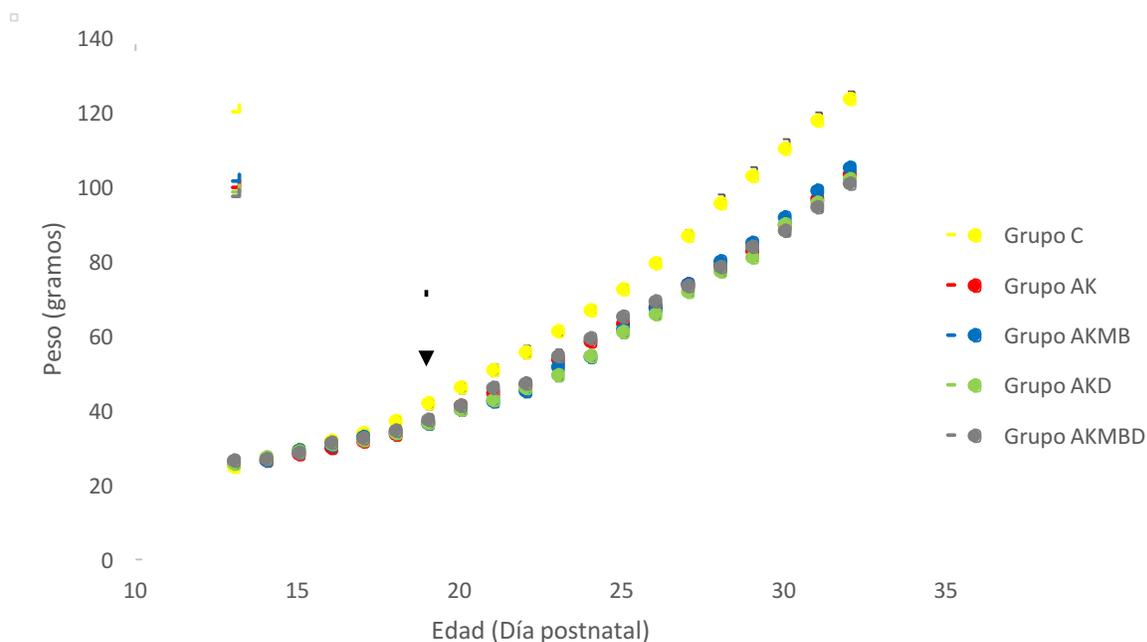


Figura 11. Medias de los pesos en gramos a lo largo del tratamiento. Evaluación realizada en 4 subgrupos de ratas de la cepa Sprague Dawley (n = 6 por subgrupo). La flecha indica el día (19 PN) en que comienza a observarse el aumento de peso diferencial por parte del grupo C con respecto a los demás grupos experimentales.

También se evaluó el daño morfológico hepático que pudieron ocasionar los tratamientos crónicos. Para los grupos que recibieron 5 días de tratamiento (17 PN), no hubo signos de daño hepático, sin embargo en los grupos que recibieron 20 días de tratamiento (32 PN) sólo los grupos AKMB y AKMBD presentaron cambios hepáticos en algunas áreas del hígado, es decir, sólo a los grupos que se les administró el extracto de Maqui berry (Figura 12)

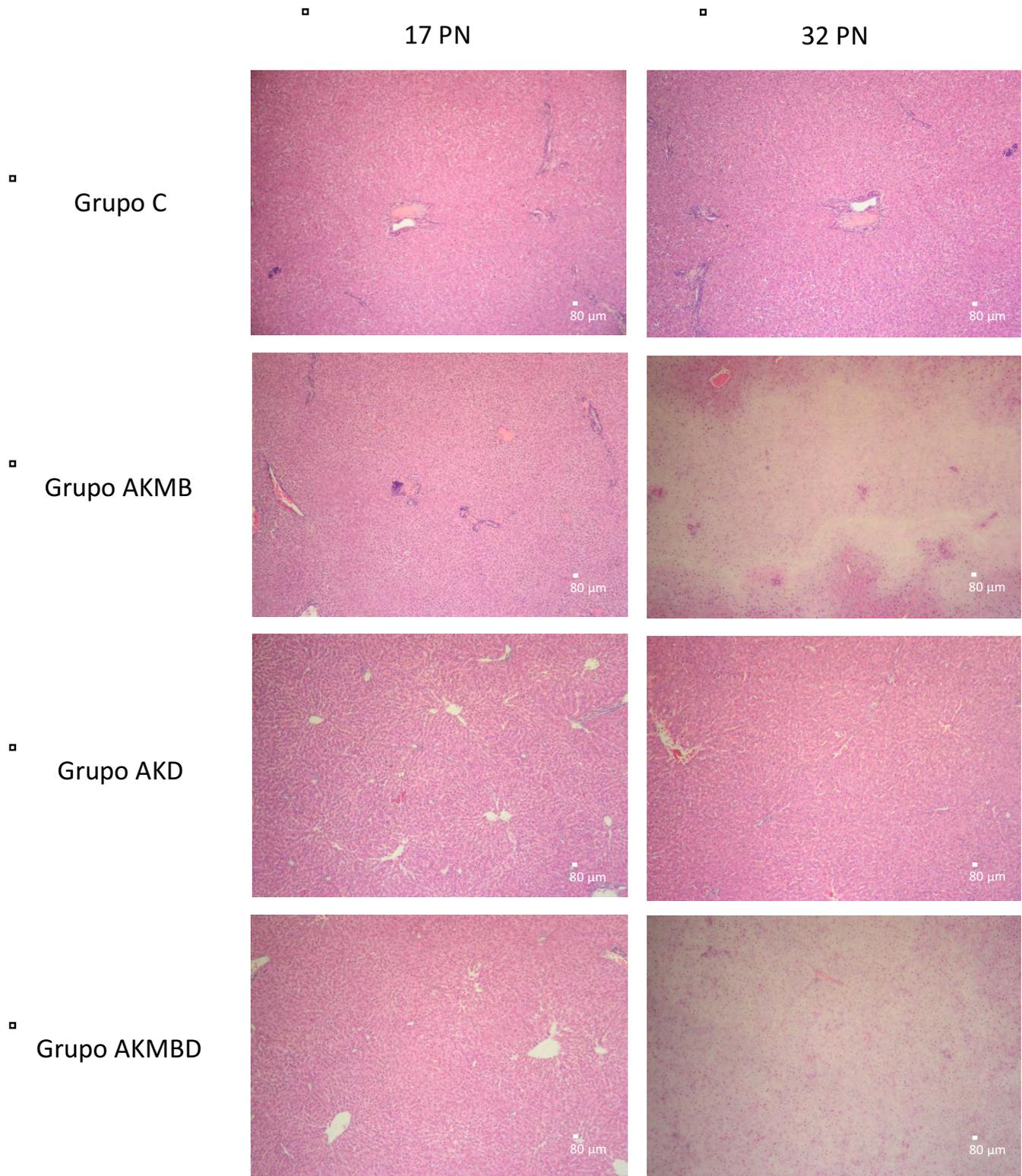


Figura 12. Tinción HE en cortes histológicos de hígado de rata a los 17 y 32 días PN. Se puede observar el daño hepático en los grupos de 32 días PN y que consumieron el extracto de Maqui berry.

8.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CONVULSIVA

8.2.1 FRECUENCIA DE CONVULSIONES AL DÍA 17 PN

Para la crisis convulsivas de fase II (sacudidas de cabeza y cuerpo), el grupo AK presentó una frecuencia media de 4.5 ± 0.61 conv / hora, el grupo AKMB 4.16 ± 0.74 conv / hora, el grupo AKD 2.83 ± 0.3 conv / hora y el grupo AKMBD 2 ± 0.36 conv / hora.

El análisis estadístico mostró una diferencia significativa entre el grupo AK y los grupos AKD ($p < 0.026$) y AKMBD ($p < 0.017$). (Figura 13).

En el grupo AK, el 100 % de los animales presentaron convulsiones de fase II mientras que un 83% de los animales para el grupo AKMB, un 68% para el grupo AKD y un 83% para el grupo AKMBD.

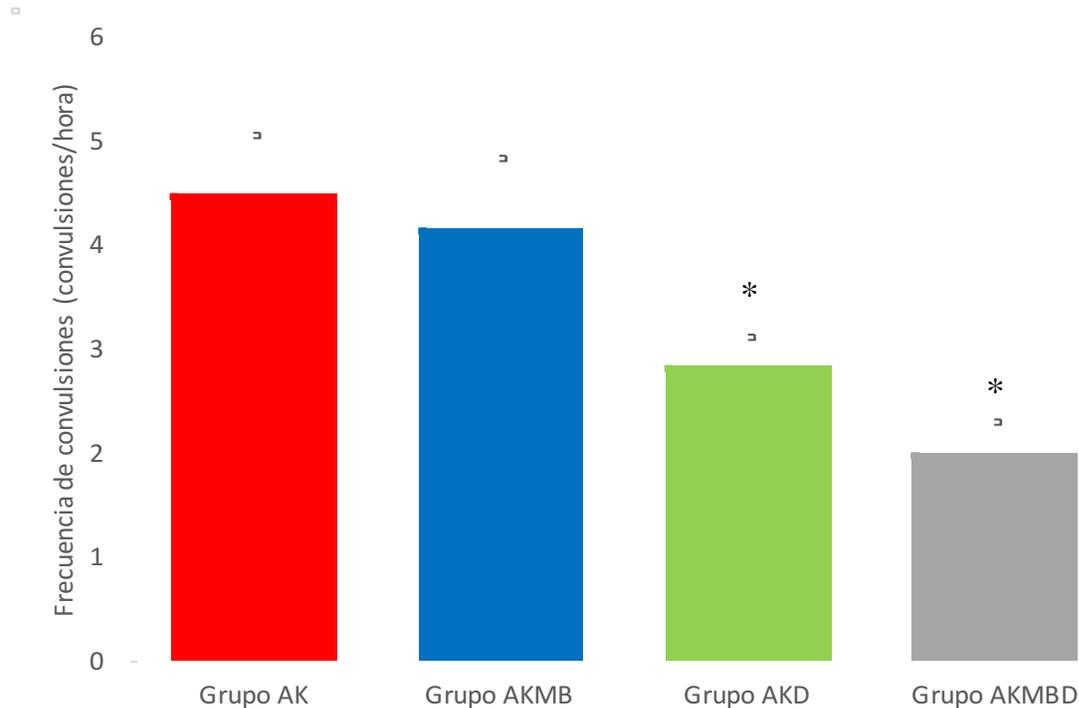


Figura 13. Número de crisis convulsivas de fase II por hora (no. de convulsiones/hora) a los 17 días PN. Evaluación realizada en 4 subgrupos de ratas de la cepa Sprague Dawley (n = 6 por subgrupo). ANOVA de una vía con una prueba post hoc Tukey ($\alpha = 0.05$). *Diferencia significativa entre el grupo AK y los grupos AKD ($p < 0.026$) y AKMBD ($p < 0.017$).

Para las crisis convulsivas de fase III (mioclonías unilaterales), el grupo AK presento una frecuencia media 6.83 ± 0.54 conv / hora, para el grupo AKMB 2.66 ± 0.61 conv / hora, para el grupo AKD 2.83 ± 0.3 conv / hora y para el grupo AKMBD 3.16 ± 0.4 conv / hora.

El análisis estadístico mostró una diferencia significativa del grupo AK con todos los demás grupos experimentales ($p < 0.01$) (Figura 14).

En el grupo AK, el 100 % de los animales presentaron convulsiones de fase III mientras que un 83% de los animales para el grupo AKMB, un 68% para el grupo AKD y un 83% para el grupo AKMBD.

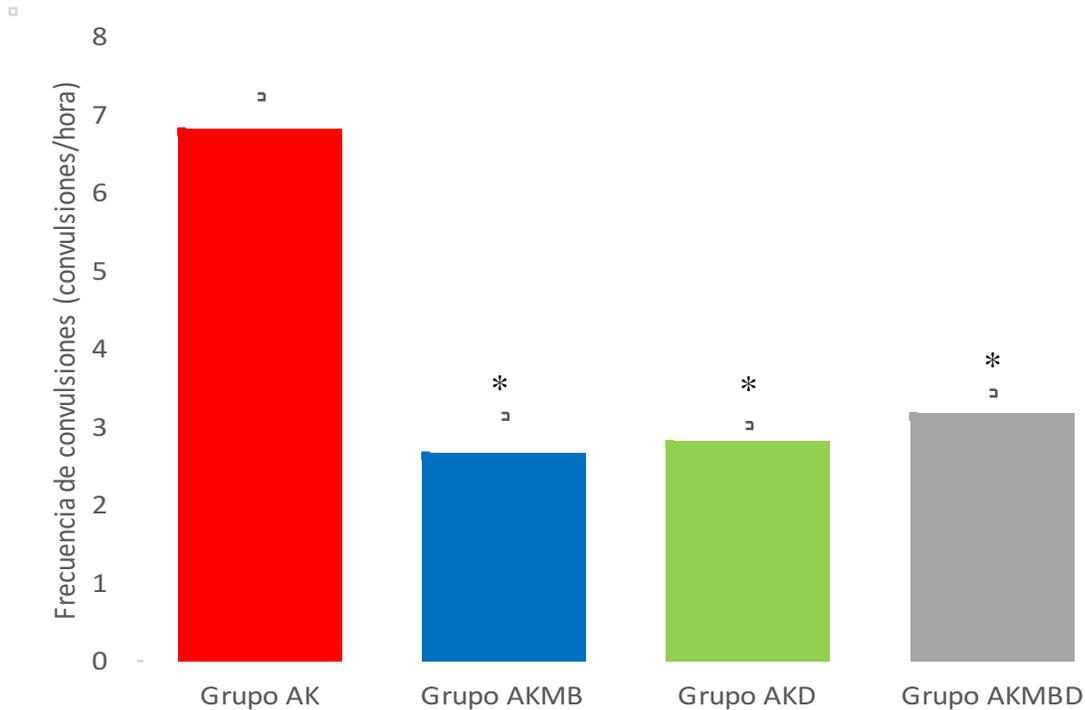


Figura 14. Número de crisis convulsivas de fase III por hora (no. de convulsiones/hora) a los 17 días PN. Evaluación realizada en 4 subgrupos de ratas de la cepa Sprague Dawley ($n = 6$ por subgrupo). ANOVA de una vía con una prueba post hoc Tukey ($\alpha = 0.05$). *Diferencia significativa entre el grupo AK y todos los demás grupos experimentales. ($p < 0.01$).

8.2.2 FRECUENCIA DE LAS CONVULSIONES AL DÍA 32 PN

Para las crisis convulsivas de fase II (sacudidas de cabeza y cuerpo), el grupo AK presentó una frecuencia media de 9.5 ± 0.42 conv / hora, para el grupo AKMB 4.16 ± 0.31 conv / hora, para el grupo AKD 3.33 ± 0.33 conv / hora y para el grupo AKMBD 2.5 ± 0.42 conv / hora.

El análisis estadístico mostró una diferencia significativa del grupo AK con los demás grupos experimentales ($p < 0.009$). Del mismo modo se observaron diferencias significativas entre el grupo AKMB y los grupos AKD ($p < 0.036$) y AKMBD ($p < 0.018$) y entre el grupo AKD y el grupo AKMBD ($p < 0.036$) (Figura 15).

En todos los grupos experimentales, el 100 % de los animales presentó convulsiones de fase II, por lo tanto ninguno de los tratamientos detuvo la aparición de las convulsiones.

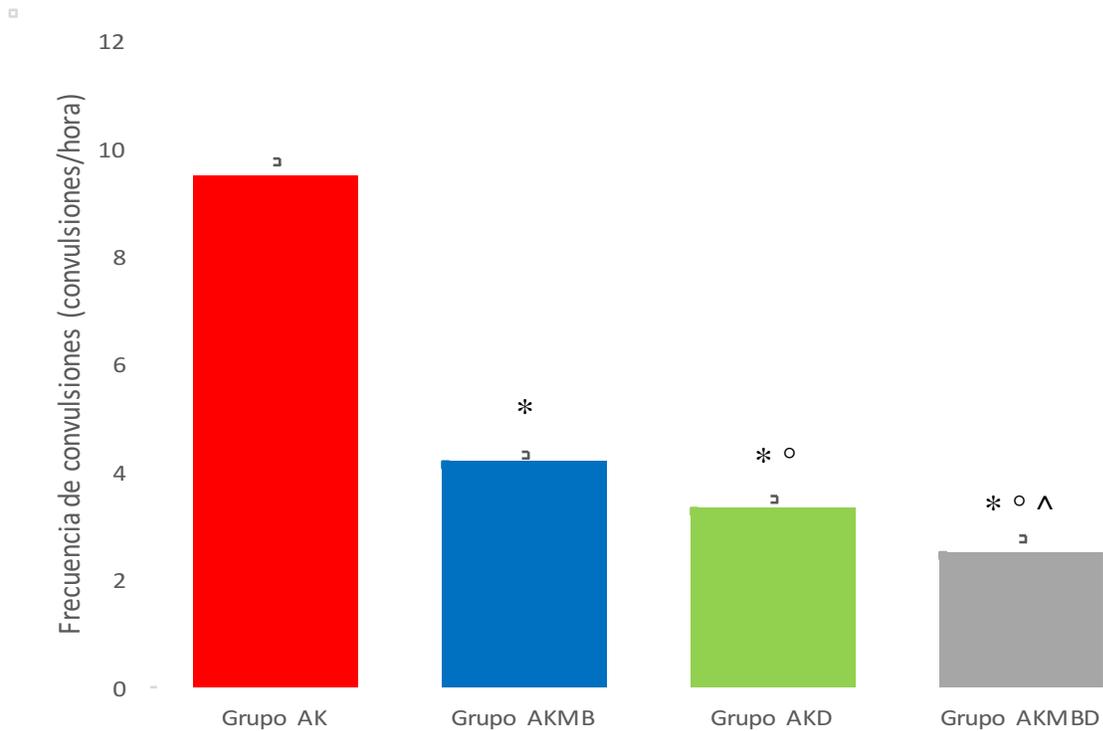


Figura 15. Número de crisis convulsivas de fase II por hora (no. de convulsiones/hora) a los 32 días PN. Evaluación realizada en 4 subgrupos de ratas de la cepa Sprague Dawley (n = 6 por subgrupo). ANOVA de una vía con una prueba post hoc Tukey ($\alpha = 0.05$). * Diferencia entre el grupo AK con los demás grupos experimentales ($p < 0.009$) ° Diferencia entre el grupo AKMB y los grupos AKD ($p < 0.036$) y AKMBD ($p < 0.018$) ^ Diferencia significativa entre el grupo AKD y el grupo AKMBD ($p < 0.036$).

Al realizar el análisis de la frecuencia de las crisis convulsivas a lo largo del tratamiento se observa que en el grupo AK comenzaron a incrementarse las crisis a partir del día 17 PN, las cuales fueron aproximadamente de 9 conv / hora. En cuanto al resto de los grupos experimentales el aumento de crisis se dio también a partir del día 17 PN, por lo tanto no hubo un retraso en la aparición de dicho aumento. Es importante notar que la frecuencia de las convulsiones fue menor que el grupo AK y que el grupo AKD permaneció más constante con el número de convulsiones a lo largo del tratamiento. (Figura 16)

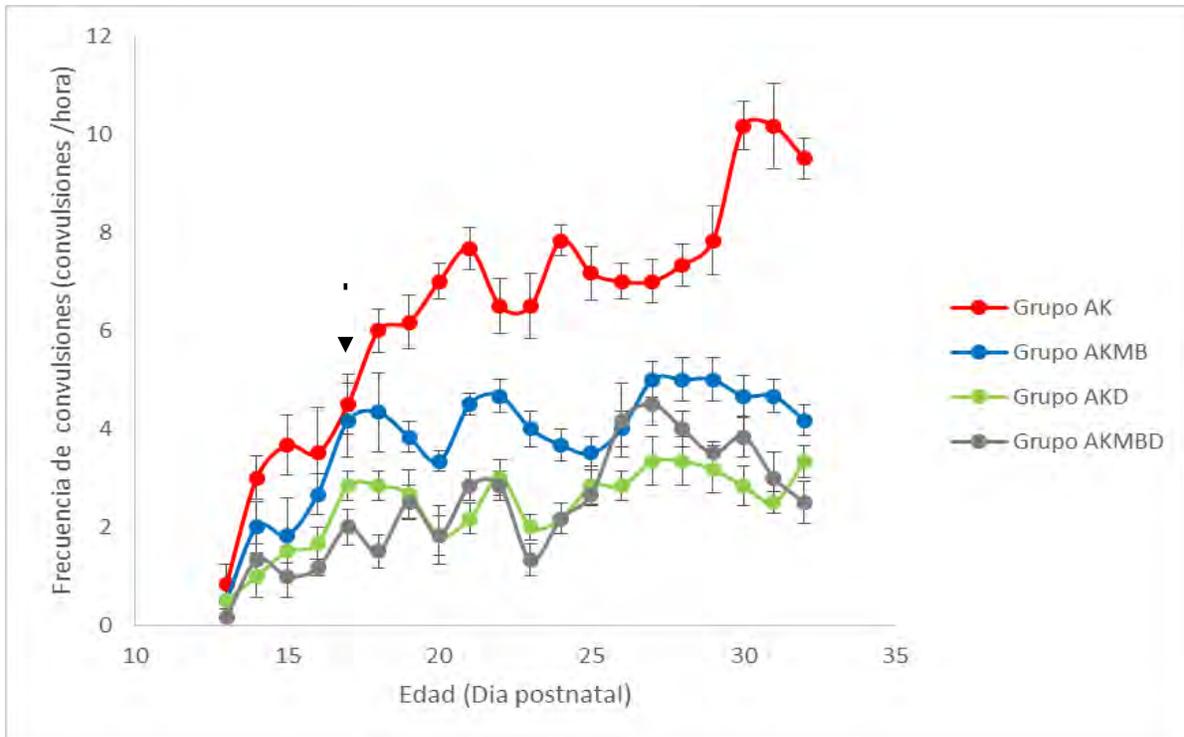


Figura 16. Número de convulsiones de fase II por hora (no. de convulsiones/hora) a lo largo del tratamiento. Evaluación realizada en 4 subgrupos de ratas de la cepa Sprague Dawley (n = 6 por subgrupo). La flecha indica el día en que comienza el aumento del número de crisis (día 17 PN).

Para la fase III (mioclonías unilaterales), el grupo AK presentó una frecuencia media de 24.83 ± 1.04 conv / hora, el grupo AKMB 20.66 ± 0.33 conv / hora, el grupo AKD 14 ± 0.63 conv / hora y el grupo AKMBD 11.33 ± 0.8 conv / hora.

El análisis estadístico mostró una diferencia significativa del grupo AK con los demás grupos experimentales ($p < 0.012$). Del mismo modo se observó una diferencia significativa entre el grupo AKMB y los grupos AKD ($p < 0.007$) y AKMBD ($p < 0.005$) y entre el grupo AKD y el grupo AKMBD ($p < 0.002$). En todos los grupos experimentales, el 100 % de los animales presentó convulsiones de fase III, por lo tanto ninguno de los tratamientos detuvo la aparición de las convulsiones.

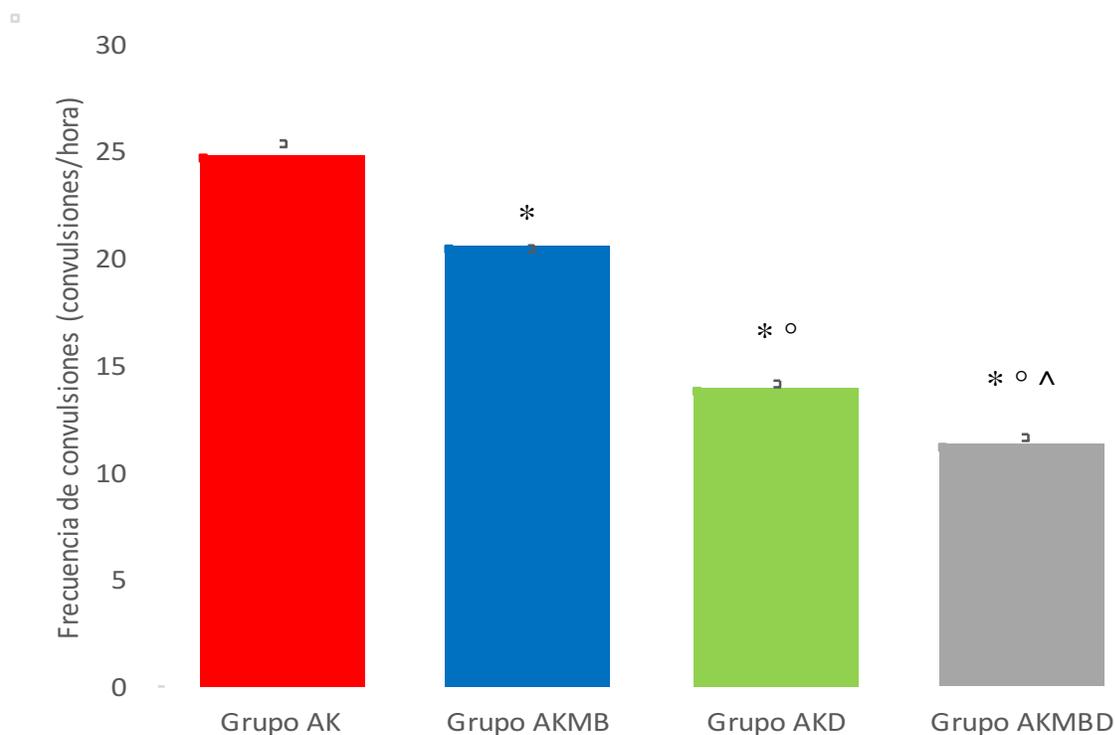


Figura 16. Número de convulsiones de fase III por hora (no. de convulsiones/hora) a los 32 días PN. Evaluación realizada en 4 subgrupos de ratas de la cepa Sprague Dawley (n = 6 por subgrupo). ANOVA de una vía con una prueba post hoc Tukey ($\alpha = 0.05$). * Diferencia entre el grupo AK con los demás grupos experimentales ($p < 0.012$) ° Diferencia entre el grupo AKMB y los grupos AKD ($p < 0.007$) y AKMBD ($p < 0.005$) ^ Diferencia significativa entre el grupo AKD y el grupo AKMBD ($p < 0.01$).

Al realizar el análisis del número de crisis convulsivas a lo largo del tratamiento se observa que el grupo AK presenta un aumento de las crisis convulsivas a partir del día 21 PN, los cuales se elevan a valores mayores de 20 conv / hora. En cuanto al grupo AKMB y al grupo AKMBD se observa un retraso en la aparición del aumento de crisis hasta el día 25 PN donde el grupo AKMBD presenta valores inferiores al grupo AKMB. En el grupo AKD se observa un retraso en la aparición del aumento de crisis hasta el día 26 PN presentando valores similares a los encontrados en el grupo AKMBD. (Figura 17).

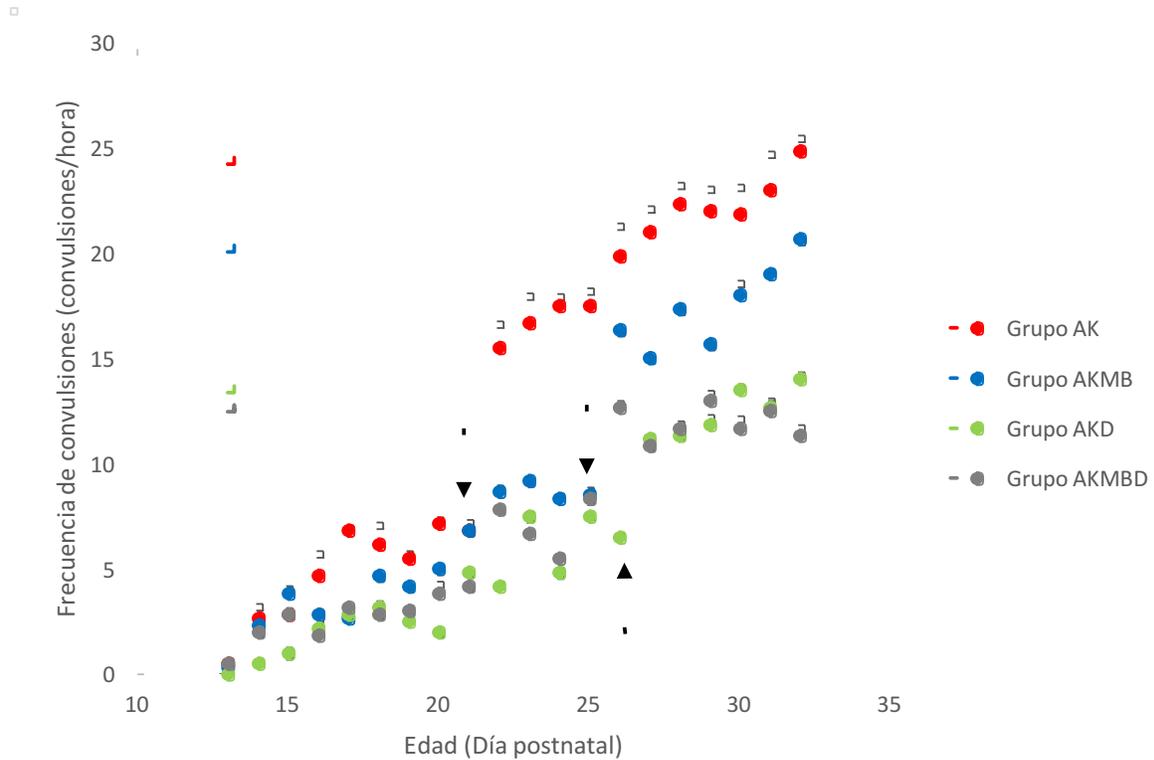


Figura 17. Número de convulsiones de fase III por hora (no. de convulsiones/hora) a lo largo del tratamiento. Evaluación realizada en 4 subgrupos de ratas de la cepa Sprague Dawley (n = 6 por subgrupo). Las flechas negras indican el día en el que se presenta en cada grupo el aumento de crisis convulsivas, para el grupo AK al día 20 PN, para el grupo AKMB y el grupo AKMBD al día 25 PN y para el grupo AKD al día 26 PN.

8.3 EVALUACIÓN DEL DAÑO NEURONAL

Se evaluó el número de células en degeneración (marcadas por el Fluoro Jade) por milímetro cuadrado (mm²). En hipocampo dorsal al día 17 PN, el grupo AK presentó un total de 163.66 ± 10.41 células / mm², el grupo AKMB 141.32 ± 8.43 células / mm², el grupo AKD 90.66 ± 8.74 células / mm² y el grupo AKMBD 122.66 ± 6.25 células / mm² (Figura 19)

El análisis estadístico mostró una diferencia significativa del grupo AK con todos los demás grupos (p < 0.001). Del mismo modo se observó una diferencia significativa entre los grupos AKMB y los grupos AKD (p < 0.01) y AKMB (p < 0.02) y entre los grupos AKD y AKMBD (p < 0.016) (Figura 20).

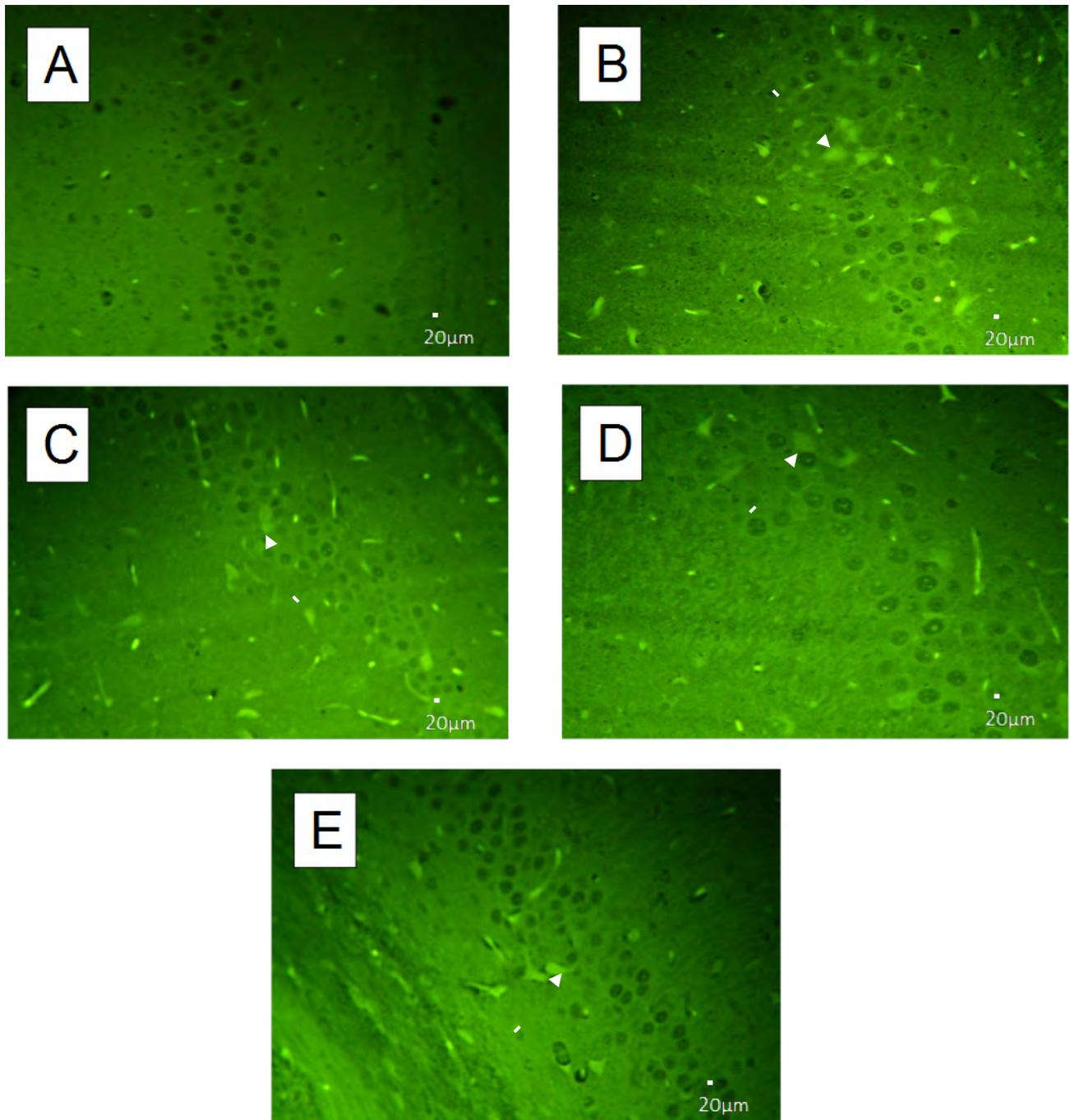


Figura 19. Fotomicrografías que muestran células en proceso de degeneración marcadas con Fluoro Jade en hipocampo (CA1) de ratas de 17 días PN. A) Grupo Control B) Grupo AK C) Grupo AKMB D) Grupo AKD E) Grupo AKMBD.

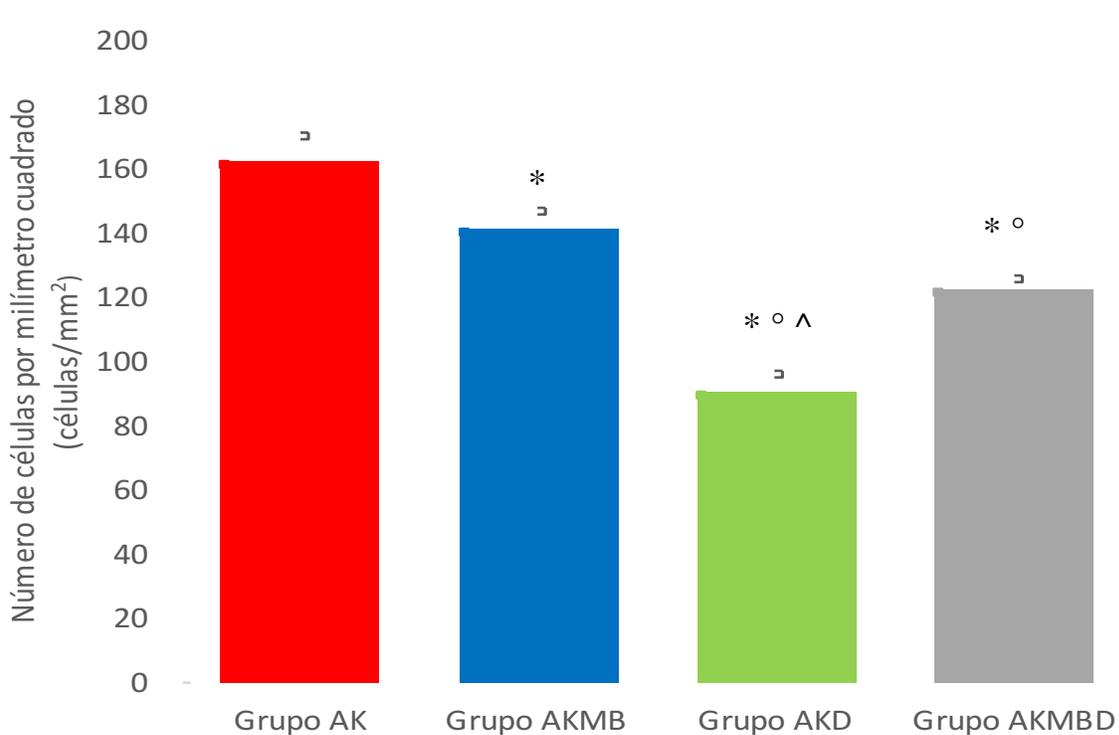


Figura 20. Número de células por milímetro cuadrado (células / mm²) en hipocampo a los 17 días PN. Evaluación realizada en 4 subgrupos de ratas de la cepa Sprague Dawley (n = 3 por subgrupo). ANOVA de una vía con una prueba post hoc Tukey ($\alpha = 0.05$). * Diferencia entre el grupo AK con los demás grupos experimentales ($p < 0.001$) ° Diferencia entre el grupo AKMB y los grupos AKD ($p < 0.01$) y AKMBD ($p < 0.02$) ^ Diferencia significativa entre el grupo AKD y el grupo AKMBD ($p < 0.016$).

En el núcleo central de la amígdala al día 17 PN, el grupo AK presentó un total de 909.3 ± 41.46 células / mm², el grupo AKMB 386.65 ± 18.08 células / mm², el grupo AKD 181.32 ± 15.54 células / mm² y el grupo AKMBD 301.32 ± 16.05 células / mm² (Figura 21)

El análisis estadístico mostró una diferencia significativa del grupo AK con todos los demás grupos ($p < 0.002$). Del mismo modo se observó una diferencia significativa entre los grupos AKMB y los grupos AKD ($p < 0.007$) y AKMBD ($p < 0.018$). Por último dicha se diferencia se observó también entre los grupos AKD y AKMBD ($p < 0.013$) (Figura 22).

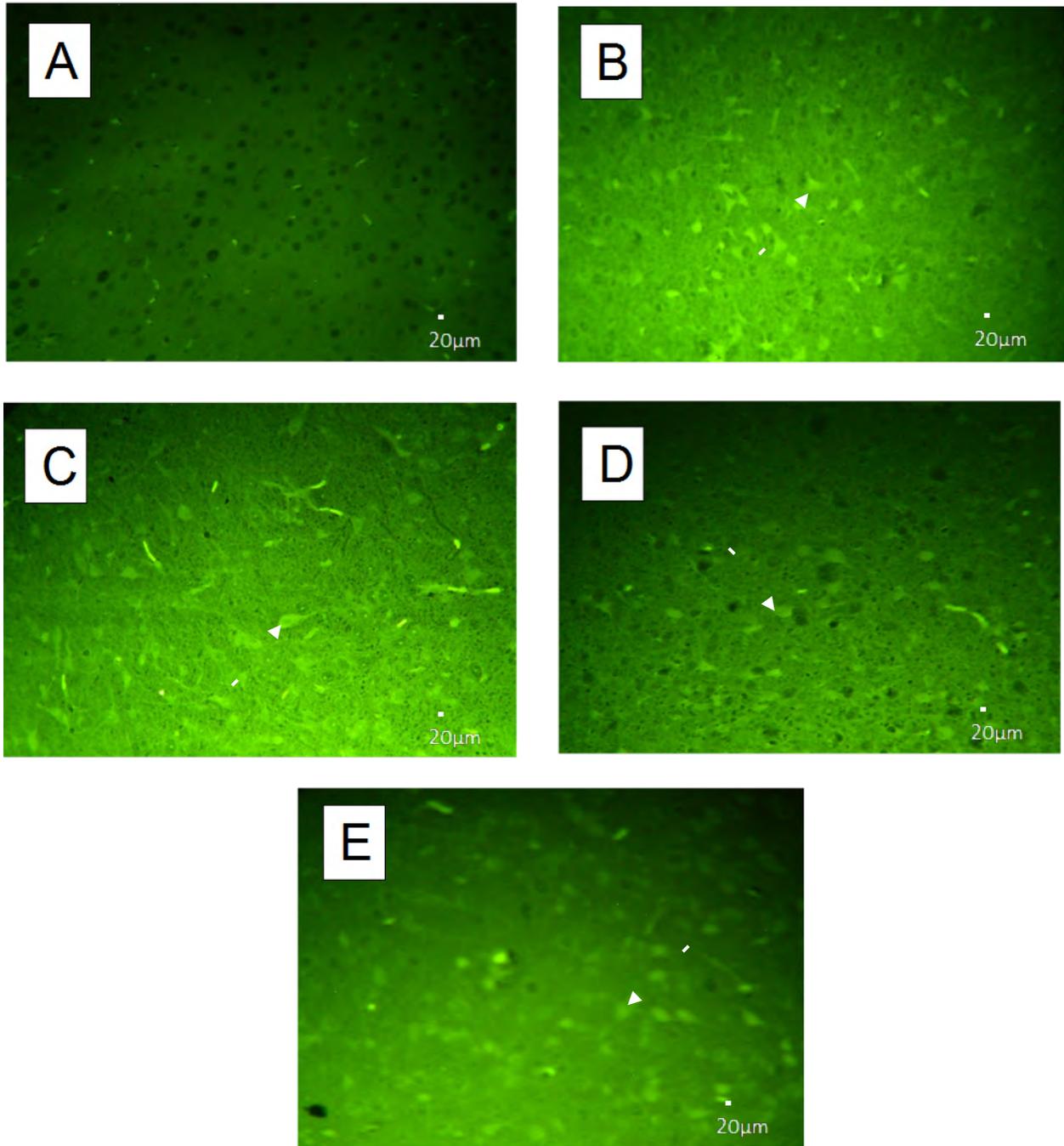


Figura 21. Fotomicrografías que muestran células en proceso de degeneración marcadas con Fluoro Jade en el núcleo central de la amígdala de ratas de 17 días PN. A) Grupo Control B) Grupo AK C) Grupo AKMB D) Grupo AKD E) Grupo AKMBD

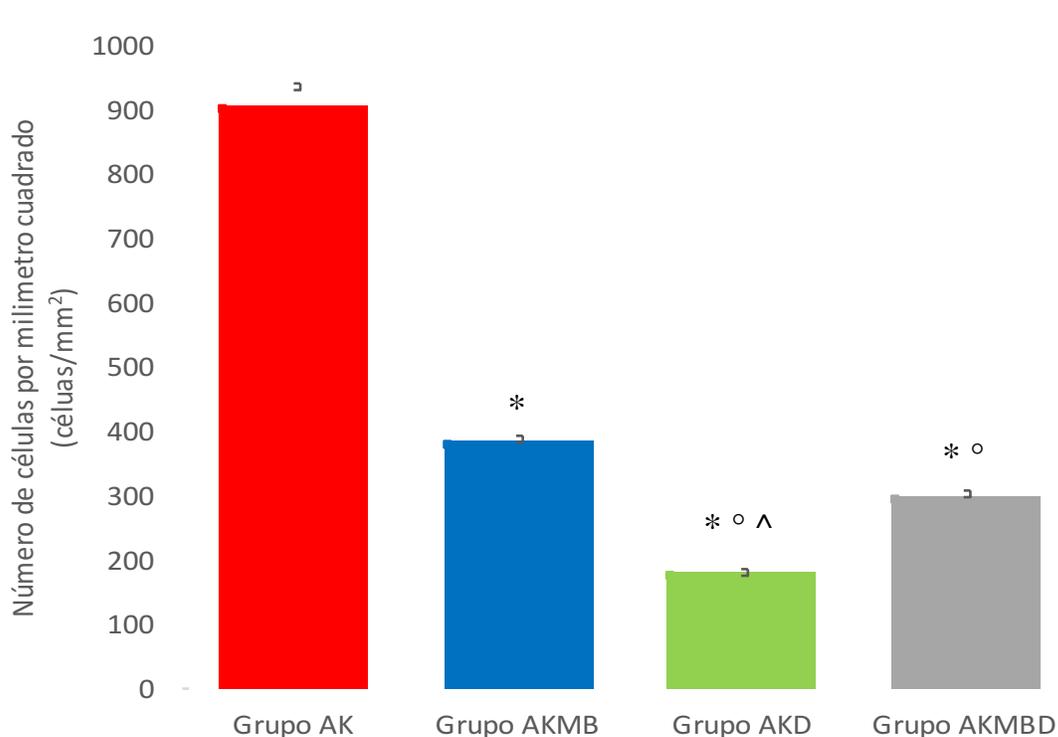


Figura 22. Número de células por milímetro cuadrado (células / mm²) en amígdala a los 17 días PN. Evaluación realizada en 4 subgrupos de ratas de la cepa Sprague Dawley (n = 3 por subgrupo). ANOVA de una vía con una prueba post hoc Tukey ($\alpha = 0.05$). * Diferencia entre el grupo AK con los demás grupos experimentales ($p < 0.002$) ° Diferencia entre el grupo AKMB y los grupos AKD ($p < 0.007$) y AKMBD ($p < 0.018$) ^ Diferencia significativa entre el grupo AKD y el grupo AKMBD ($p < 0.013$).

En corteza temporal al día 17 PN, el grupo AK presentó un total de 1343.95 ± 21.53 células / mm², el grupo AKMB 1138.63 ± 18.37 células / mm², el grupo AKD 893.3 ± 26.46 células / mm² y el grupo AKMBD 991.96 ± 14.42 células / mm² (Figura 23)

El análisis estadístico mostró una diferencia significativa del grupo AK con todos los demás grupos ($p < 0.001$). Del mismo modo se observó una diferencia significativa entre los grupos AKMB y los grupos AKD ($p < 0.005$) y AKMBD ($p < 0.008$). Por último dicha se diferencia se observó también entre los grupos AKD y AKMBD ($p < 0.01$) (Figura 24).

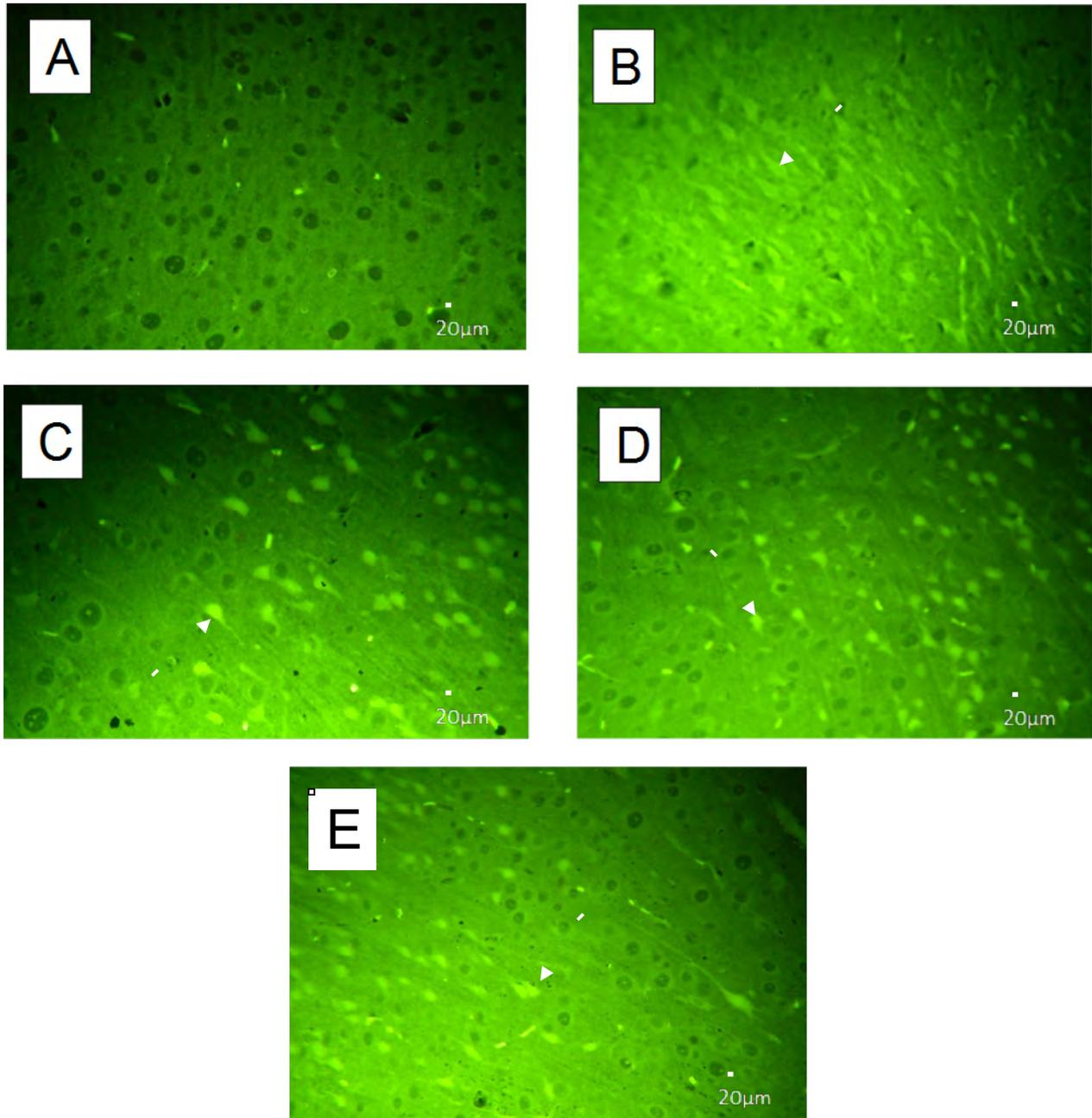


Figura 21. Fotomicrografías que muestran células en proceso de degeneración con Fluoro Jade en corteza temporal de ratas de 17 días PN. A) Grupo Control B) Grupo AK C) Grupo AKMB D) Grupo AKD E) Grupo AKMBD

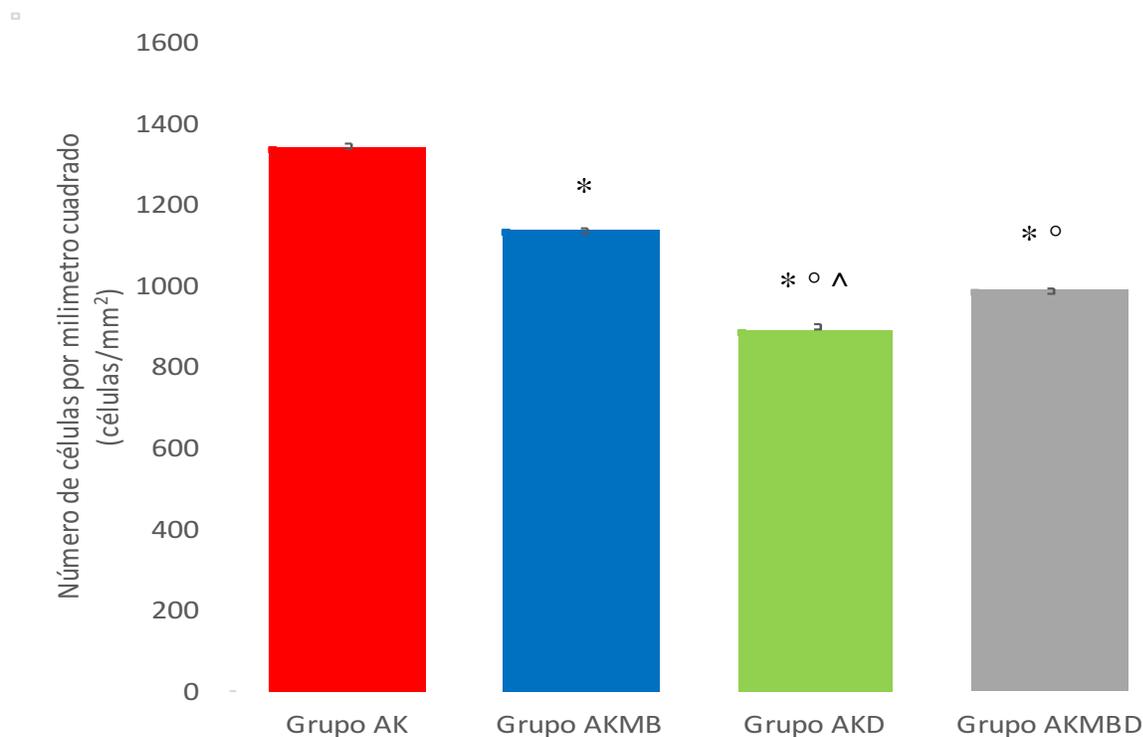


Figura 22. Número de células por milímetro cuadrado (células / mm²) en corteza a los 17 días PN. Evaluación realizada en 4 subgrupos de ratas de la cepa Sprague Dawley (n = 3 por subgrupo). ANOVA de una vía con una prueba post hoc Tukey ($\alpha = 0.05$). * Diferencia entre el grupo AK con los demás grupos experimentales ($p < 0.001$) ° Diferencia entre el grupo AKMB y los grupos AKD ($p < 0.005$) y AKMBD ($p < 0.008$) ^ Diferencia significativa entre el grupo AKD y el grupo AKMBD ($p < 0.01$).

En las tres áreas cerebrales estudiadas al día 32 PN no se observaron células teñidas con el Fluoro Jade en los tres grupos experimentales. Por consiguiente se realizó una inmunohistoquímica para GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein, proteína que forma los filamentos intermedios de las células gliales) para observar la presencia de gliosis reactiva o cicatriz glial.

Todos los grupos, excepto el grupo control, resultaron positivos en la inmunohistoquímica contra GFAP con lo cual se verificó la presencia de una gliosis reactiva posterior a una neurodegeneración, la cual se observó al día 17 PN. Fue más evidente en el grupo AK comparado con los demás grupos experimentales, sin embargo en el grupo AKD se observó menor glía reactiva (Figura 23).

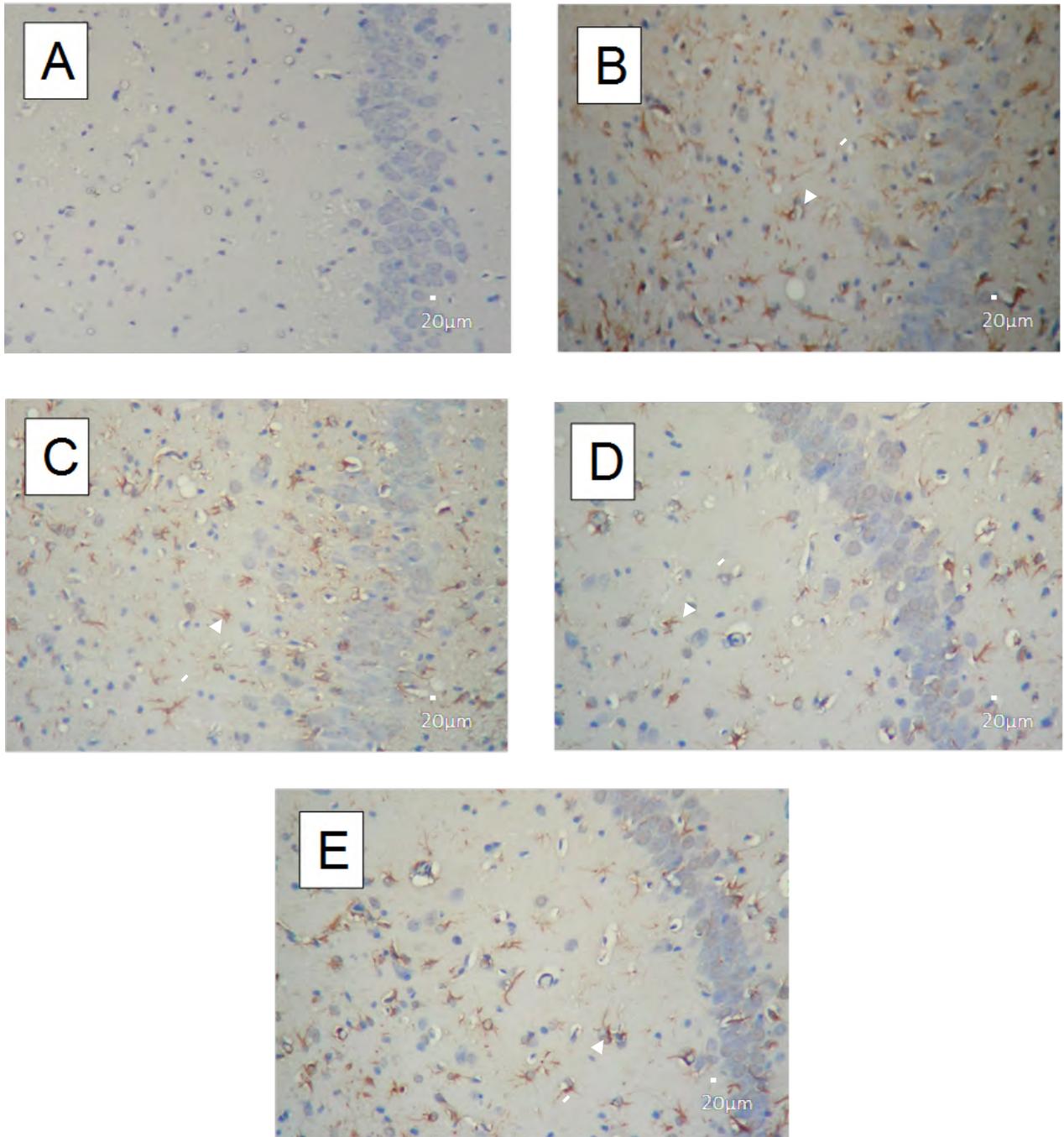


Figura 23. Fotomicrografías que muestran células inmunoreactivas a GFAP en el área CA1 del hipocampo de ratas de 32 días PN. A) Grupo Control B) Grupo AK C) Grupo AKMB D) Grupo AKD E) Grupo AKMBD

8.4 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS PROINFLAMATORIAS

8.4.1 WESTERN BLOT

Se realizó la cuantificación de proteínas proinflamatorias IL-1 β , COX2 y el factor de transcripción NF κ B. A las 6 h después de la inyección de ácido kaínico, en todas las estructuras y en todas las proteínas hubo un aumento en su expresión relativa respecto a su grupo control comprobando que el modelo de ácido kaínico genera neuroinflamación (Figuras 24-26).

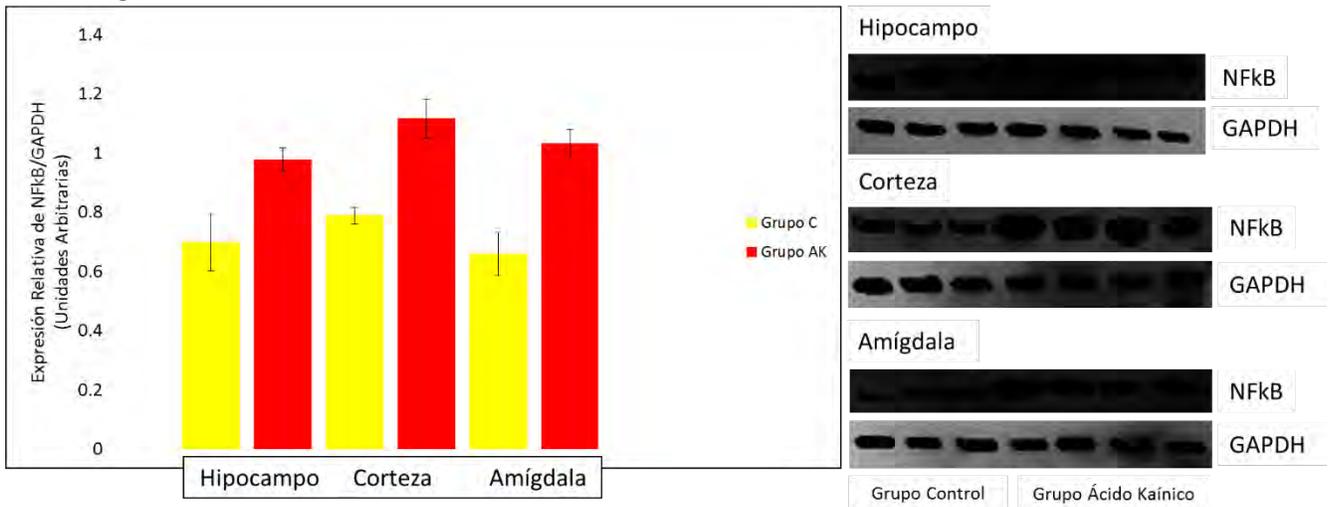


Figura 24. Expresión relativa de NF κ B / GAPDH en hipocampo, corteza temporal y amígdala a las 6 h después de la inyección de ácido kaínico. Evaluación realizada en ratas de la cepa Sprague Dawley (n = 3 grupo C, n = 4 grupo AK). Prueba t de Student ($\alpha = 0.05$). Los tres tejidos presentaron diferencias significativas respecto a su grupo control (hipocampo [p < 0.01], corteza temporal [p < 0.029] y amígdala [p < 0.011]).

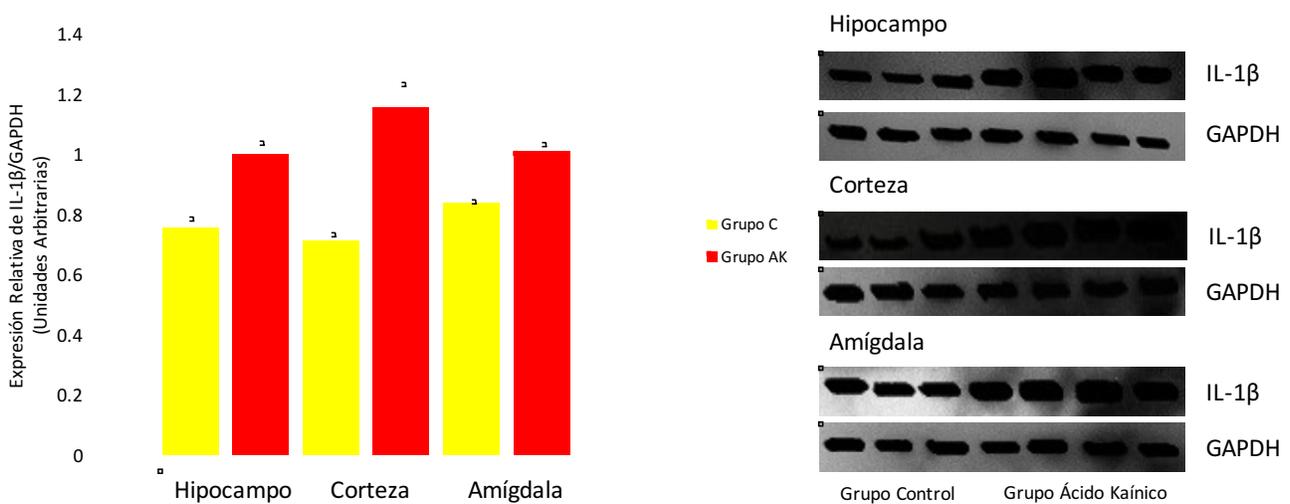


Figura 25. Expresión relativa de IL-1 β / GAPDH en hipocampo, corteza temporal y amígdala a las 6 h después de la inyección de ácido kaínico. Evaluación realizada en ratas de la cepa Sprague Dawley (n = 3 grupo C, n = 4 grupo AK). Prueba t de Student ($\alpha = 0.05$). Los tres tejidos presentaron diferencias significativas respecto a su grupo control (hipocampo [p < 0.018], corteza temporal [p < 0.012] y amígdala [p < 0.033]).

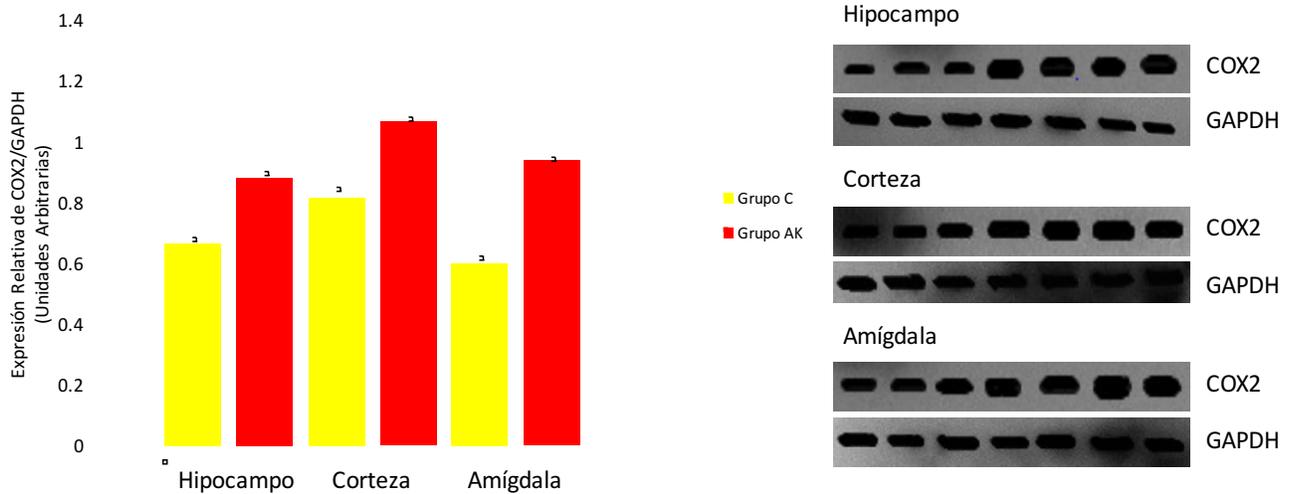


Figura 25. Expresión relativa de COX2 / GAPDH en hipocampo, corteza temporal y amígdala a las 6 h después de la inyección de ácido kaínico. Evaluación realizada en ratas de la cepa Sprague Dawley (n = 3 grupo C, n = 4 grupo AK). Prueba t de Student ($\alpha = 0.05$). Los tres tejidos presentaron diferencias significativas respecto a su grupo control (hipocampo [$p < 0.005$], corteza temporal [$p < 0.008$] y amígdala [$p < 0.0003$]).

En los grupos de 24 horas se observó lo siguiente:

- NFkB (Figura 26):** En el hipocampo se observó un aumento en la expresión relativa de todos los grupos con ácido kaínico con respecto al grupo control ($p < 0.009$). También se observó un disminución en la expresión relativa con respecto al grupo AK en los grupos AKMB ($p < 0.023$) y AKD ($p < 0.016$). No se observaron diferencias significativas entre ellos.

En la corteza temporal se observó un aumento en la expresión relativa de todos los grupos con ácido kaínico con respecto al grupo control ($p < 0.008$). También se observó una disminución en la expresión relativa con respecto al grupo AK en los grupos AKMB ($p < 0.032$), AKD ($p < 0.015$) y AKMBD ($p < 0.023$). Por último se observó una diferencia significativa del grupo AKD con respecto a los grupos AKMB y AKMBD ($p < 0.044$).

En la amígdala se observó un aumento en la expresión relativa de todos los grupos con ácido kaínico con respecto al grupo control ($p < 0.008$). También se observó una disminución en la expresión relativa con respecto al grupo AK en los grupos AKMB ($p < 0.021$), AKD ($p < 0.01$) y AKMBD ($p < 0.015$). Por último se observó una diferencia significativa del grupo AKD con respecto a los grupos AKMB y AKMBD ($p < 0.029$).

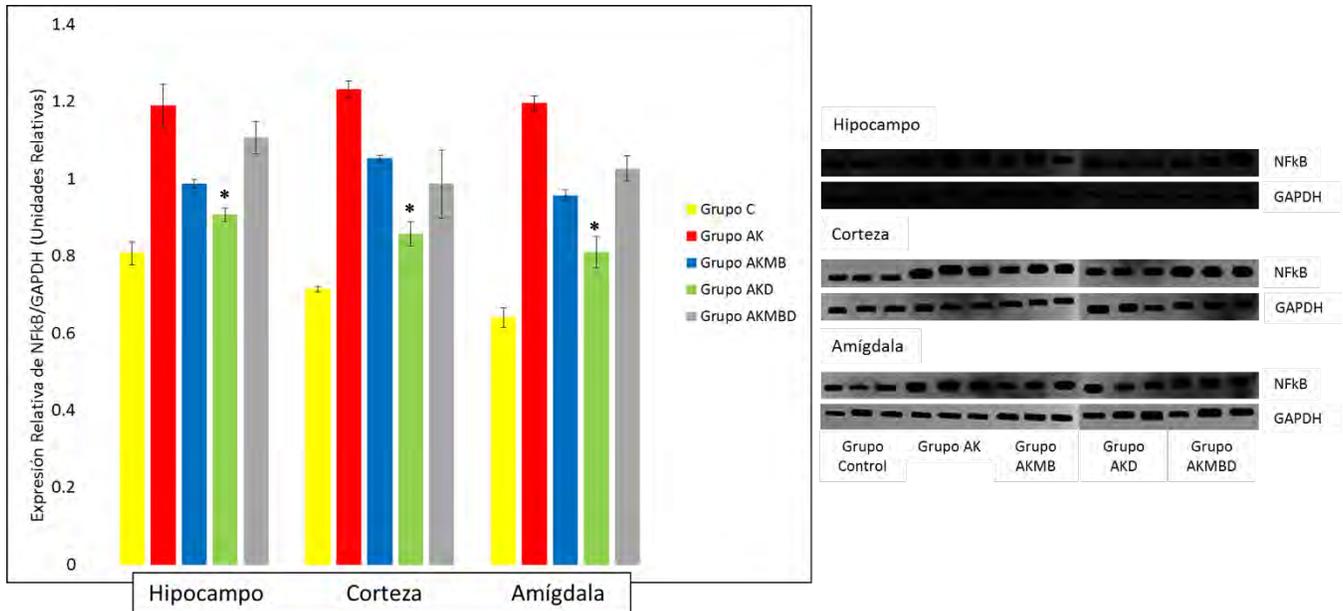


Figura 26. Expresión relativa de NFkB / GAPDH en hipocampo, corteza temporal y amígdala a las 24 h después de la inyección de ácido kaínico. Evaluación realizada en ratas de la cepa Sprague Dawley (n = 3 por subgrupo). ANOVA de una vía con una prueba post hoc Tukey ($\alpha = 0.05$). * Diferencia significativa del grupo con menor expresión relativa (Hipocampo [$p < 0.016$], corteza temporal [$p < 0.044$], amígdala [$p < 0.029$]).

- IL-1 β (Figura 27):** En el hipocampo se observó un aumento en la expresión relativa de todos los grupos con ácido kaínico con respecto al grupo control ($p < 0.001$). También se observó una disminución en la expresión relativa con respecto al grupo AK solamente en el grupo AKD ($p < 0.029$). No se observaron diferencias significativas en los grupos AKMB y AKMBD comparado con el grupo AK.

En la corteza temporal se observó un aumento en la expresión relativa de todos los grupos con ácido kaínico con respecto al grupo control ($p < 0.0004$). También se observó una disminución en la expresión relativa con respecto al grupo AK en los grupos AKMB ($p < 0.034$), AKD ($p < 0.02$) y AKMBD ($p < 0.031$). Por último se observó una diferencia significativa del grupo AKD con respecto a los grupos AKMB y AKMBD ($p < 0.048$).

En la amígdala se observó un aumento en la expresión relativa de todos los grupos con ácido kaínico con respecto al grupo control ($p < 0.002$). También se observó una disminución en la expresión relativa con respecto al grupo AK solamente en el grupo AKD ($p < 0.028$).

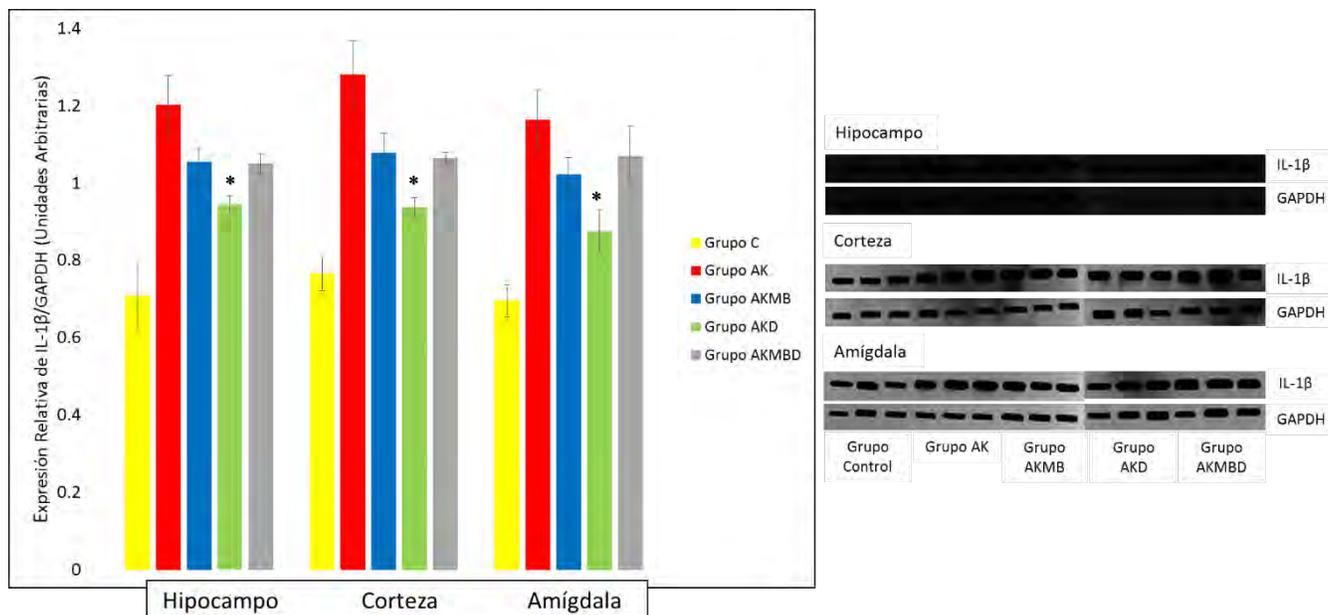


Figura 27. Expresión relativa de IL-1β / GAPDH en hipocampo, corteza temporal y amígdala a las 24 h después de la inyección de ácido kaínico. Evaluación realizada en ratas de la cepa Sprague Dawley (n = 3 por subgrupo). ANOVA de una vía con una prueba post hoc Tukey ($\alpha = 0.05$). * Diferencia significativa del grupo con menor expresión relativa (Hipocampo [$p < 0.029$], corteza temporal [$p < 0.048$], amígdala [$p < 0.028$]).

- COX2 (Figura 28):** En el hipocampo se observó un aumento en la expresión relativa de todos los grupos con ácido kaínico con respecto al grupo control ($p < 0.0003$). Del mismo modo se observó una disminución en la expresión relativa con respecto al grupo AK en los grupos AKMB ($p < 0.036$), AKD ($p < 0.016$). No se observaron diferencias significativas en los grupos AKMB y AKMBD con respecto al grupo AK. En la corteza temporal se observó un aumento en la expresión relativa de todos los grupos con ácido kaínico con respecto al grupo control ($p < 0.0006$). También se observó una disminución en la expresión relativa con respecto al grupo AK solamente en el grupo AKD ($p < 0.024$).

En la amígdala se observó un aumento en la expresión relativa de todos los grupos con ácido kaínico con respecto al grupo control ($p < 0.0008$). También se observó una disminución en la expresión relativa con respecto al grupo AK en los grupos AKMB ($p < 0.049$), AKD ($p < 0.019$) y AKMBD ($p < 0.043$). Por último se observó una diferencia significativa del grupo AKD con respecto a los grupos AKMB y AKMBD ($p < 0.032$).

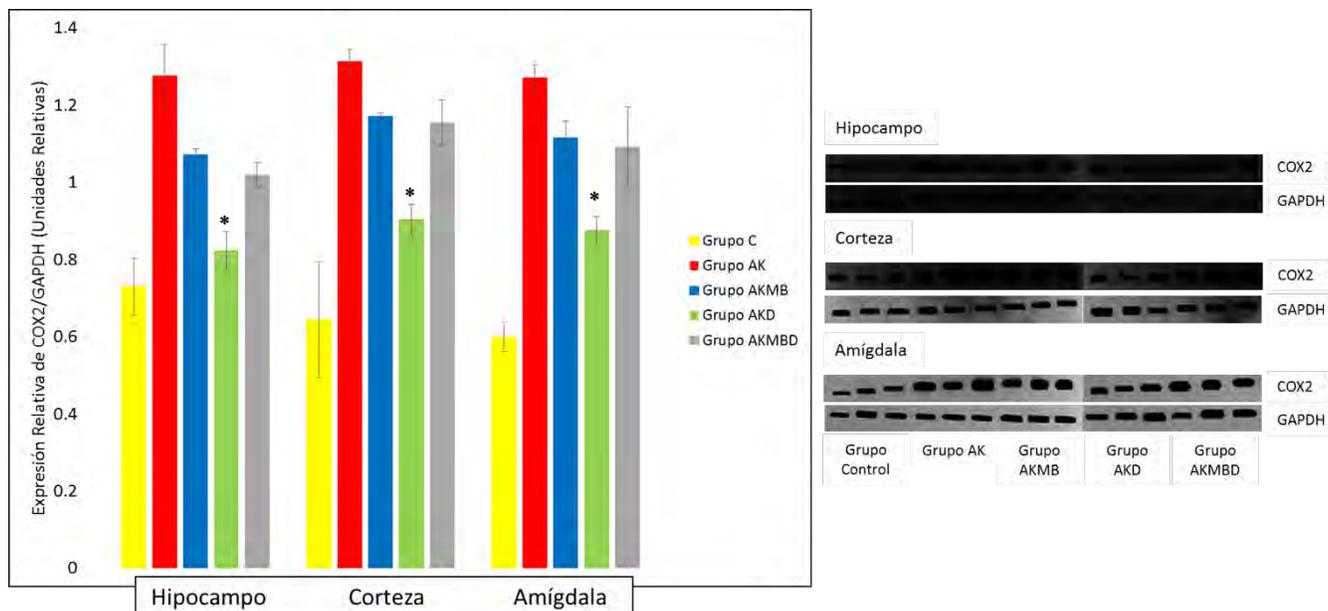


Figura 28. Expresión relativa de COX2 / GAPDH en hipocampo, corteza temporal y amígdala a las 24 h después de la inyección de ácido kaínico. Evaluación realizada en ratas de la cepa Sprague Dawley (n = 3 por subgrupo). ANOVA de una vía con una prueba post hoc Tukey ($\alpha = 0.05$). * Diferencia significativa del grupo con menor expresión relativa (Hipocampo [$p < 0.016$], corteza temporal [$p < 0.024$], amígdala [$p < 0.032$]).

8.4.2 INMUNOFLUORESCENCIAS

Se revisaron las inmunofluorescencias en las áreas CA1, CA3 y giro dentado del hipocampo (principales zonas que son afectadas por el ácido kaínico) para identificar la expresión a nivel celular de las proteínas NFkB, IL-1 β y COX2.

A los 5 días de tratamiento se observó presencia de las tres proteínas en todos los grupos que recibieron inyección. Dicha expresión fue baja debido a que muy pocas células presentaron la marca fluorescente.

A los 20 días de tratamiento solamente se observó presencia de las tres proteínas en el grupo AK. En los grupos que recibieron tratamiento y en el grupo control se observó baja expresión de la proteínas en las áreas del hipocampo estudiadas.

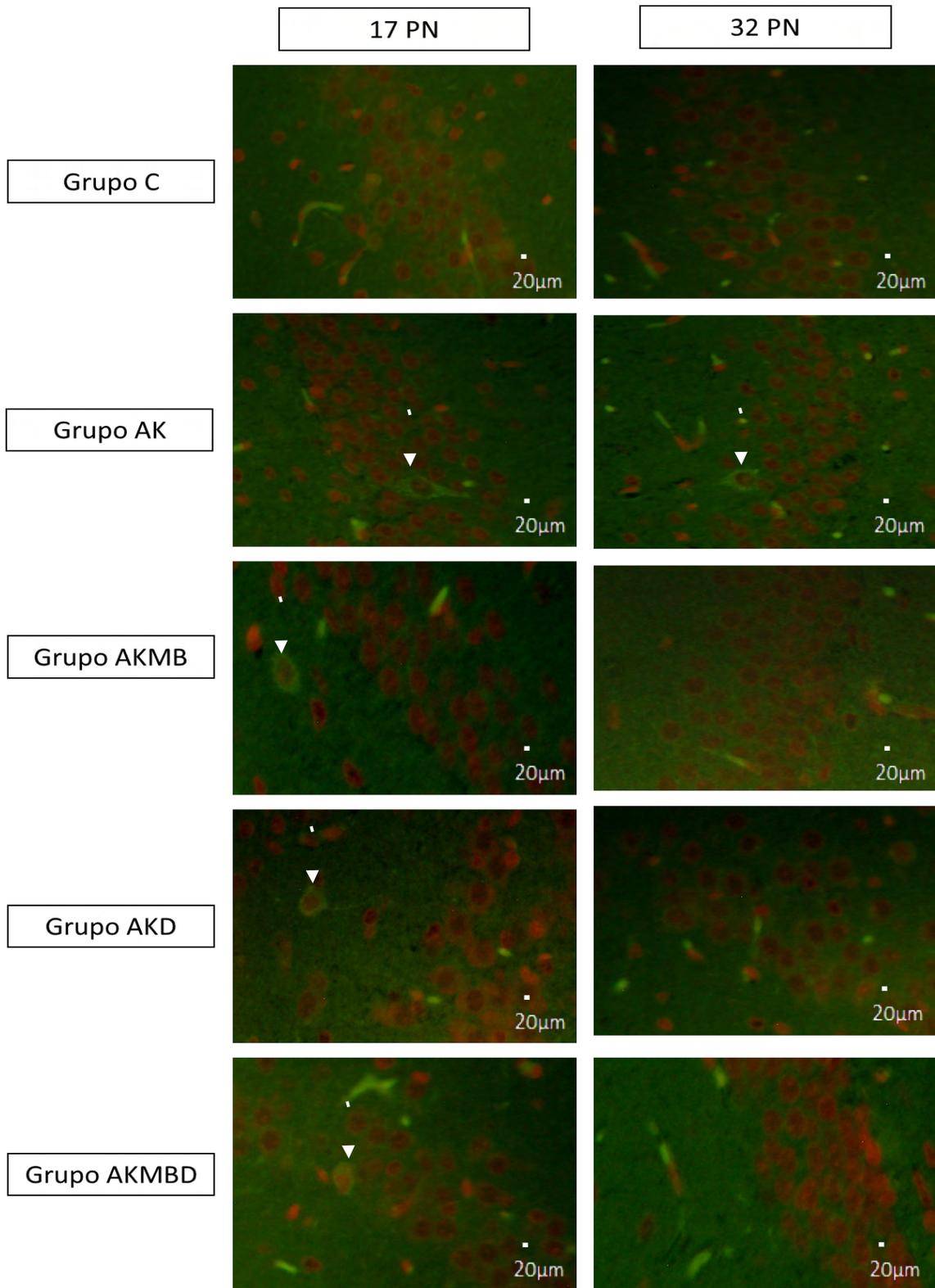


Figura 29. Fotomicrografías que muestran células inmunoreactivas a NFκB en las áreas CA1, CA3 y giro dentado del hipocampo. Las flechas blancas indican la marca fluorescente.

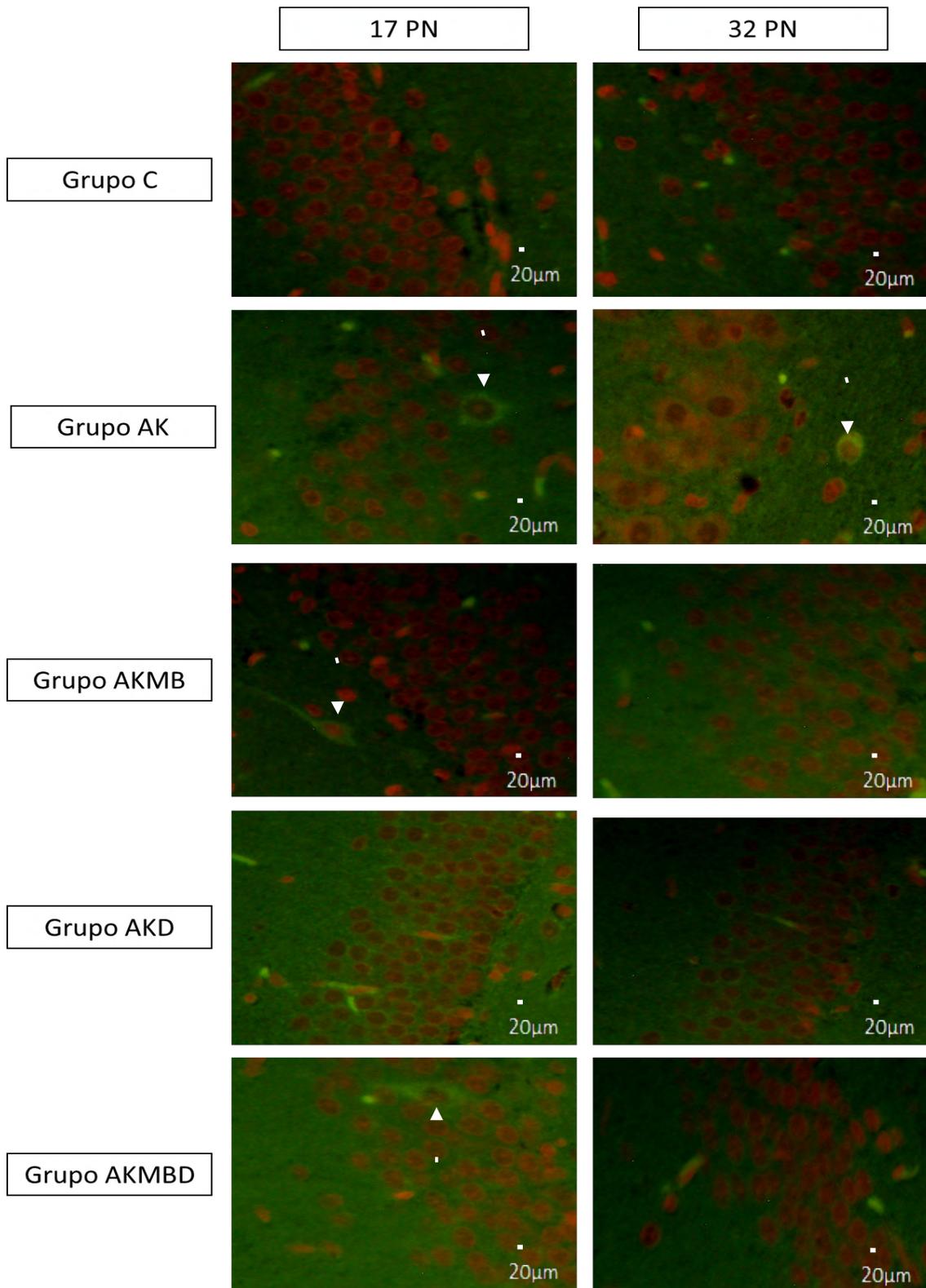


Figura 30. Fotomicrografías que muestran inmunoreactivas a IL-1 β en las áreas CA1, CA3 y giro dentado del hipocampo. Las flechas blancas indican la marca fluorescente.

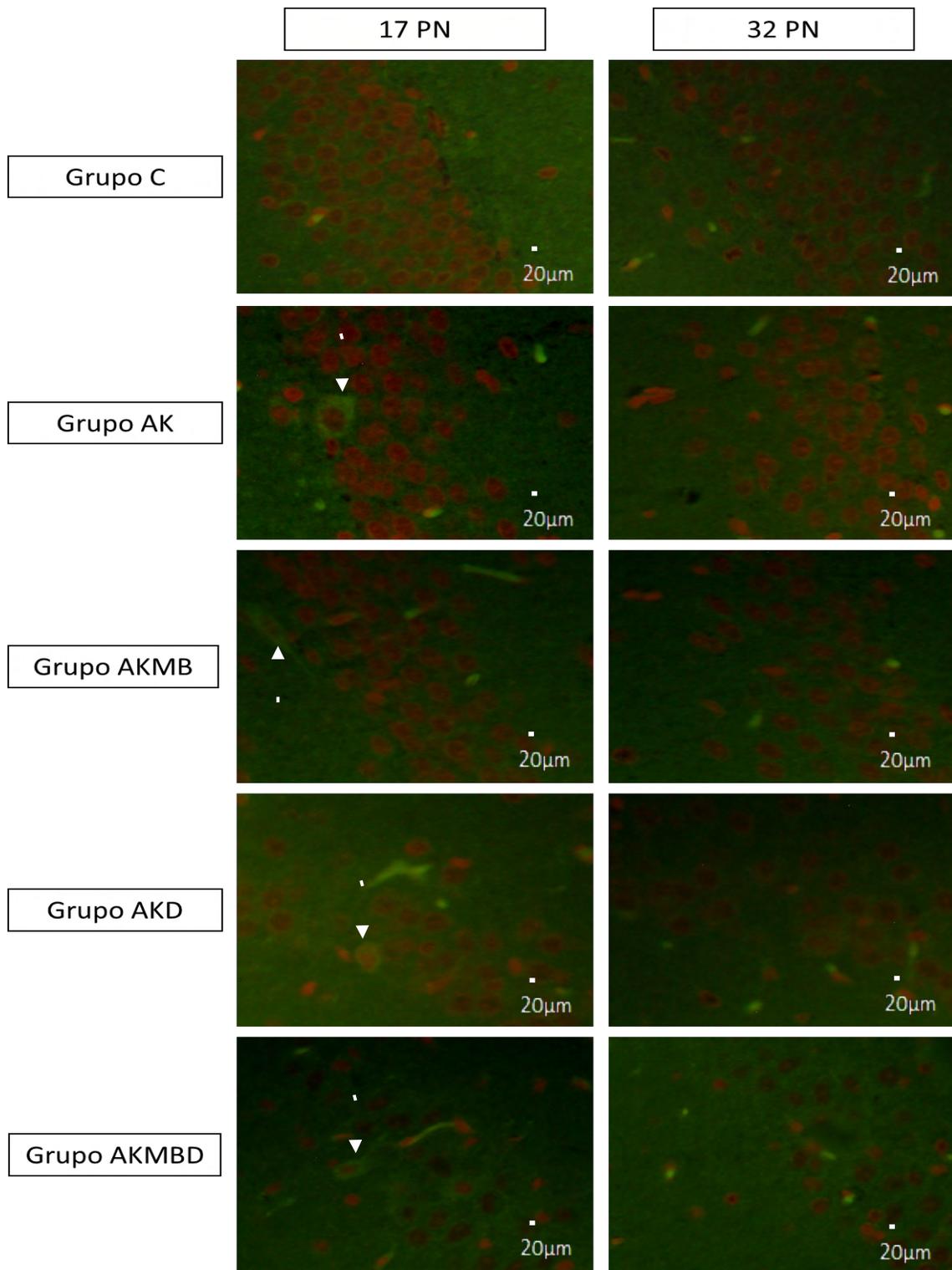


Figura 30. Fotomicrografías que muestran células inmunoreactivas a COX2 en las áreas CA1, CA3 y giro dentado del hipocampo. Las flechas blancas indican la marca fluorescente.

9. DISCUSIÓN

Estudios experimentales han demostrado que el daño asociado a las crisis convulsivas es mucho mayor en el cerebro inmaduro (Jensen, 2000), lo que establece a estas crisis como un factor de riesgo para el neurodesarrollo en niños y por consecuencias el desarrollo de la epilepsia. La participación de las moléculas proinflamatorias y el proceso inflamatorio sobre la epileptogénesis ha sido documentada, por lo que se les considera como un blanco a intervenir para evitar el desarrollo de la epilepsia.

Los resultados del presente trabajo mostraron los efectos del extracto de Maqui berry y la Dapsona así como su combinación en la actividad convulsiva. Se observó a los 5 días de tratamiento (17 días postnatal) que produjo una disminución en la frecuencia de la crisis de fase II, observada en los grupos AKD y AKMBD, siendo este último el grupo con menor número de convulsiones, mientras que, para las crisis de fase III se observó una disminución en la frecuencia en todos los grupos experimentales sin mostrar diferencias entre ellos. Para los 20 días de tratamiento (32 días postnatal) se observó una disminución en la frecuencia de las crisis de fase II presente en todos los grupos siendo el menor, nuevamente, el grupo AKMBD. Este mismo caso se presentó para la frecuencia de convulsiones de fase III.

Estudios recientes reportan que los posibles mecanismos de acción del extracto de Maqui berry (ácido fenólicos, antocianinas y flavonoides) pueden relacionarse con la óxido nítrico sintasa (nNOS) y la vía de señalización que esta enzima desencadena y que está implicada en procesos fisiopatológicos como la inflamación crónica (Odontuya et al., 2005; Céspedes, 2010; Ojeda 2011). Por otro lado para la Dapsona se reportan que sus posibles mecanismos de acción están relacionados con el bloqueo de canales de Ca^{2+} y de los canales asociados al receptor NMDA (Leppik, 2004; Díaz, 2013).

Como se conoce, el receptor NMDA (una vez activado mediante la unión de glutamato y glicina en las subunidades correspondientes y la remoción del tapón de Mg^{2+}) permite la entrada de iones Ca^{2+} (principalmente) y Na^+ . La entrada de Ca^{2+} a las neuronas tiene distintos efectos intracelulares, entre los cuales están: Activación de la enzima óxido nítrico

sintasa (nNOS), activación de las cinasas SAPK (stress activated protein kinases) y la expresión de genes mediada por NFkB (proteínas proinflamatorias como IL-1β y COX 2) y por último, la activación de las enzimas fosfolipasa A₂ (que sintetiza el ácido araquidónico, sustrato de la COX2) y la NADPH oxidasa, que contribuye a la producción del ion superóxido (O₂⁻) junto con la xantino oxidasa (XO) y la mitocondria.

El óxido nítrico sintetizado reacciona con el ion superóxido para formar el ion peroxinitrito (ONOO⁻) que tiene varios efectos biológicos incluyendo la activación de canales de Ca²⁺ (como el canal TRPM7) que aumentará el flujo de Ca intracelular, participando así en la fase tardía de la excitotoxicidad que posteriormente provocara muerte celular (Figura 31).

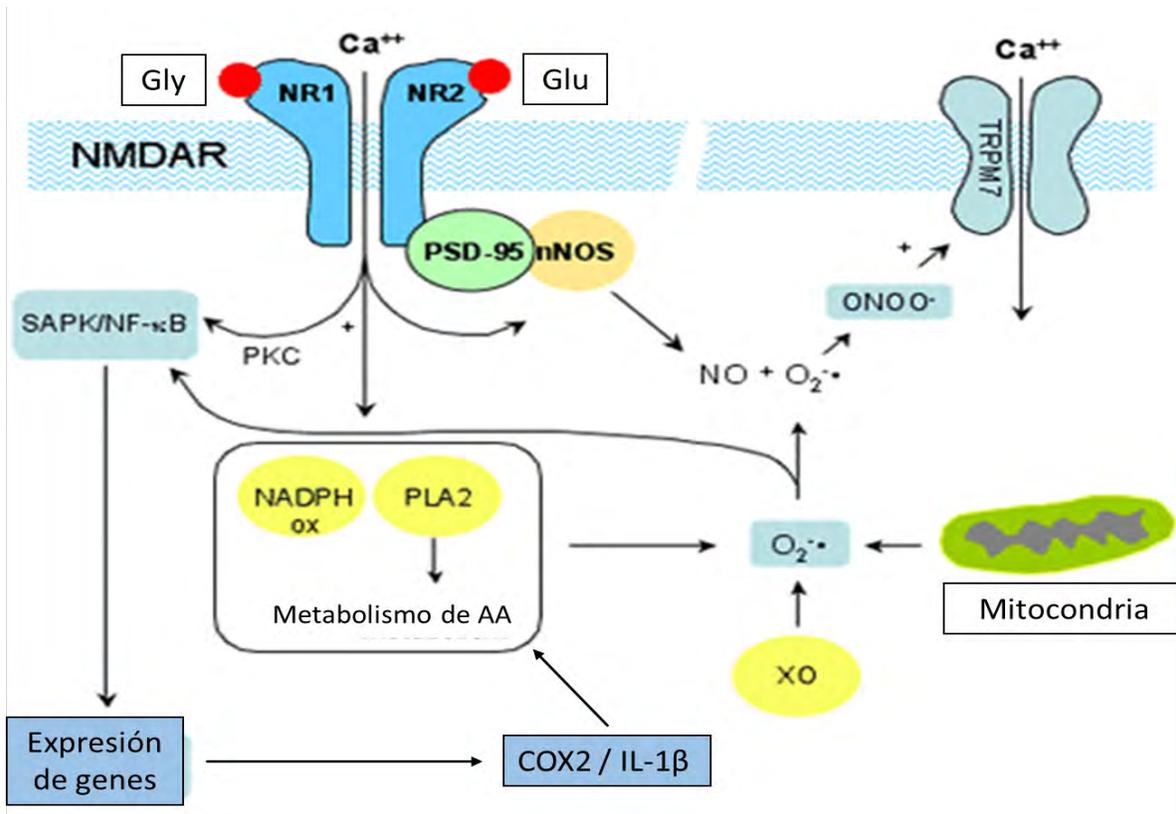


Figura 31. Vía de señalización intracelular desencadenada por la activación de los receptores NMDA.

Por lo anteriormente señalado, la participación de la dapsona en la modulación del canal de Ca²⁺ produce efectos sobre la hipersincronización neuronal provocada por la convulsión. Este mecanismo de acción lo poseen otros fármacos anticonvulsivantes como la zonisamida y se adjudican los mecanismos de acción de la zonisamida a la dapsona debido a que ambas

moléculas poseen una estructura química similar (grupo sulfona en ambas moléculas) (Altagracia, 1994; Díaz, 2013)

En cuanto al extracto de Maqui berry, este no tuvo un efecto anticonvulsivante suficiente para detener la actividad convulsiva sin embargo la dapsona demostró un efecto anticonvulsivo, el cual ya había sido reportado previamente en animales adultos (Díaz, 2013).

Sobre los efectos neuroprotectores de los tratamientos, a los 5 días de tratamiento (17 días PN) se observó una disminución en el número de neuronas en degeneración en el hipocampo los grupos AKMB, AKD y AKMBD, sin embargo la dapsona tuvo un mayor efecto neuroprotector con menor número de células en degeneración y con diferencias significativas respecto a los otros dos grupos. Esta misma tendencia se observó en la amígdala y la corteza temporal. Probablemente este efecto esté relacionado con su efecto anticonvulsivante debido a la inactivación de los canales asociados al canal NMDA, anteriormente mencionado.

Por otro lado, el bloqueo del flujo de Ca^{2+} intracelular impide la activación de enzimas dependientes de calcio y que a su vez desencadena señalizaciones que finalizan en expresión de genes, en este caso del NFkB, que sintetiza proteínas proinflamatorias (IL-1 β y COX2). Estas proteínas generan un daño en la barrera hematoencefálica, lo que dispara un proceso de inflamación que produce hiperexcitabilidad y daño neuronal (Vezzani et al., 2013) También se evitaría el daño por excitotoxicidad ya que no habría activación de la nNOS.

En cuanto al extracto de Maqui berry, los efectos neuroprotectores demostrado por la reducción de neuronas en proceso de degeneración pueden deberse a su capacidad de inhibir la nNOS y evitar la muerte celular por excitotoxicidad (Céspedes, 2010; Ojeda, 2011; Reyes et al., 2014). Es importante notar que en el grupo AKMBD (combinación de ambos tratamientos) no se observó un efecto sinérgico de sus efectos y aunque ambos poseen distintos blancos dentro de la misma vía, no se potencian sus efectos.

A los 20 días de tratamiento (32 días PN) no se observaron neuronas en degeneración mediante la tinción de Fluoro-Jade por lo que se realizó una inmunohistoquímica contra GFAP para observar la presencia de gliosis reactiva, uno de los indicios de que hubo muerte

neuronal (Robel, 2015). Todos los grupos que recibieron inyección de ácido kaínico se observó presencia de GFAP con lo cual se correlaciona con la presencia de células en proceso de degeneración durante la primera semana.

A las 6 horas posteriores a la inyección de ácido kaínico hubo un aumento en la expresión de NFkB, IL-1 β y COX2 en hipocampo, corteza temporal y amígdala con respecto al grupo control. Este aumento comprueba que el modelo origina inflamación después del daño inicial y estos aumentos concuerdan con los picos de expresión reportados en estudios anteriores (Strauss et al., 2000; Williams et al., 2006).

A las 24 horas posteriores a la inyección de ácido kaínico se observó una disminución en la expresión relativa de las proteínas NFkB, IL-1 β y COX2 en el hipocampo, corteza temporal y amígdala de los grupos que recibieron el tratamiento. Los valores de expresión relativa más bajos fueron los observados en el grupo AKD con respecto a los grupos AKMB y AKMBD, aunque en algunos casos el grupo AKMB no presentaba diferencias significativas con el grupo AKD pero esta situación no se observaba en todos los casos.

Dicha disminución de la expresión de estas proteínas puede es debido al efecto antiinflamatorio atribuido a la Dapsona. Por otro lado el extracto de Maqui berry mostró una disminución menor de la expresión de dichas proteínas con respecto al grupo AK, con lo cual se puede decir que el extracto posee una actividad antiinflamatoria menor. Esta afirmación concuerda con lo reportado por Ojeda et al., 2011 donde reporta que el extracto de Maqui berry puede actuar de dos maneras: Regulación sobre la vía de señalización del PI3K, la cual interviene, entre otras cosas, en el aumento de las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ (Tsoyi et al., 2008) y aumento de la fosforilación de Akt la cual está relacionada con la degradación aumentada de I κ B α y p65, moléculas involucradas en la activación del NFkB (Kok et al., 2009).

En las inmunofluorescencias a los 5 días de tratamiento (17 días PN) se observó presencia de las proteínas proinflamatorias en las áreas CA1, CA3 y giro dentado del hipocampo en todos los animales que recibieron inyección de ácido kaínico pero a los 20 días de tratamiento dicha presencia de proteínas se observó principalmente en el grupo AK. Esto ocurre de acuerdo a

los picos de expresión de dichas proteínas que ocurren dentro de 4 a 7 horas después del insulto inicial (inyección de ácido kaínico), pasado ese tiempo las proteínas pueden ser detectables hasta 96 horas después del insulto inicial. Debido a esto no se realizaron las mediciones de expresión proteica mediante Western Blot en los grupos que recibieron 5 y 20 días de tratamiento.

En contraste, el tratamiento con la combinación del Maqui berry con la dapsona (grupo AKMBD) mostró una disminución no significativa en la expresión de proteínas proinflamatorias en comparación con el grupo AKMB. Esto puede deberse a un posible efecto antagónico del extracto Maqui berry sobre la Dapsona debido a que actúan sobre las mismas vías de señalización pero a niveles diferentes.

Es importante notar la presencia de daño hepático en los grupos que recibieron el tratamiento del extracto de Maqui berry puede deberse a lo reportado por Pérez, 2003 donde menciona que algunos flavonoides y antocianinas puede ser prooxidantes ya que, debido a sus características estructurales pueden reducir el Cu (II) a Cu (I) (Rahman et al., 1989; 1992; Brown et al., 1998), generar especies reactivas de oxígeno (Sahu, 1993; 1997) y afectar las funciones de los componentes del sistema de defensa antioxidante nuclear: glutatión y glutatión-S transferasa (Sahu, 1996). Estos efectos pueden presentarse debido a determinadas concentraciones o por consumo prolongado de extractos que contengan estas moléculas. Esta información concuerda con lo observado en los cortes histológicos de hígado donde sólo los grupos que recibieron el extracto durante 20 días mostraron signos de daño hepático.

Con base a este estudio posteriormente se propone realizar estudios aumentando la dosis del extracto de Maqui berry y no administrar tratamientos crónicos para evitar el daño hepático así como evaluar la expresión de otras moléculas de las vías de señalización desencadenada por la activación de los receptores NMDA y de la vía de activación del NFκB para establecer completamente los mecanismos de acción del extracto de Maqui berry y de la dapsona.

10. CONCLUSIONES

- El consumo prolongado del extracto de Maqui berry o dapsona no afecta el peso corporal.
- El consumo prolongado del extracto de Maqui berry origina daño hepático.
- La dapsona posee un efecto anticonvulsivante al disminuir la frecuencia de crisis y retrasar el aumento de la frecuencia de crisis mediante el bloqueo de canales de Na^+ y antagonización de los efectos del receptor NMDA.
- El extracto de Maqui berry posee un efecto anticonvulsivante menor en comparación con la dapsona mediante regulación de vías de señalización por mecanismos aún desconocidos.
- La dapsona y el efecto de Maqui berry poseen un efecto neuroprotector al disminuir el número de neuronas en degeneración posterior a la inyección de ácido kaínico mediante inhibiciones a distintos niveles en la vía de señalización desencadenada por el receptor NMDA y regulación en la vía de activación del NFkB.
- La dapsona posee un efecto antiinflamatorio al disminuir los niveles de expresión de proteínas proinflamatorias a las 24 h después de la inyección de ácido kaínico.
- El extracto de Maqui berry posee un efecto antiinflamatorio menor, en comparación con la dapsona, al disminuir los niveles de expresión de proteínas proinflamatorias a las 24 h después de la inyección de ácido kaínico de manera no significativa.

Aguiar, C. C. T., Almeida, A. B., Araújo, P. V. P., Abreu, R. N. D. C. de, Chaves, E. M. C., Vale, O. C. do Vasconcelos, S. M. M. (2012). Oxidative Stress and Epilepsy: Literature Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1–12.

Altagracia, M., Monroy-Noyola, A., Osorio-Rico, L., Kravzov, J., Alvarado-Calvillo, R., Manjarrez-Marmolejo, J., & Ríos, C. (1994). Dapsone attenuates kainic acid-induced seizures in rats. *Neuroscience Letters*, 176(1), 52–54.

Allan, S. M., Harrison, D. C., Read, S., Collins, B., Parsons, A. A., Philpott, K., & Rothwell, N. J. (2001). Selective increases in cytokine expression in the rat brain in response to striatal injection of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate and interleukin-1. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 93(2), 180–9.

Arzimanoglou, A. (2005) *Cognitive Dysfunction in Children with Temporal Lobe Epilepsy*

Bausch, S. B., & McNamara, J. O. (2004). Contributions of mossy fiber and CA1 pyramidal cell sprouting to dentate granule cell hyperexcitability in kainic acid-treated hippocampal slice cultures. *Journal of Neurophysiology*, 92(6), 3582–95.

Becher, B., Prat, A., & Antel, J. P. (2000). Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia*, 29(4), 293–304.

Beinke, S., & Ley, S. C. (2004). Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *The Biochemical Journal*, 382(Pt 2), 393–409.

Ben-Ari, Y. (1985). Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 14(2), 375–403.

Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nature Reviews. Neuroscience*, 3(9), 728–39.

Ben-Ari, Y. (2006). Basic developmental rules and their implications for epilepsy in the immature brain. *Epileptic Disorders : International Epilepsy Journal with Videotape*, 8(2), 91–102.

Ben-Ari, Y., & Cossart, R. (2000). Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends in Neurosciences*, 23(11), 580–7.

Ben-Ari, Y., & Holmes, G. L. (2005). The multiple facets of gamma-aminobutyric acid dysfunction in epilepsy. *Current Opinion in Neurology*, 18(2), 141–5.

Ben-Ari, Y., & Lagowska, J. (1978). Epileptogenic action of intra-amygdaloid injection of kainic acid]. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances de l'Académie Des Sciences. Série D: Sciences Naturelles*, 287(8), 813–6.

- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., & Gaiarsa, J. L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *The Journal of Physiology*, *416*, 303–25.
- Ben-Ari, Y., Lagowska, J., Tremblay, E., & Le Gal La Salle, G. (1979). A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Research*, *163*(1), 176–9.
- Ben-Ari, Y., Tremblay, E., Riche, D., Ghilini, G., & Naquet, R. (1981). Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience*, *6*(7), 1361–91.
- Berg, A. T., & Shinnar, S. (1994). The contributions of epidemiology to the understanding of childhood seizures and epilepsy. *Journal of Child Neurology*, *9 Suppl 2*, 19–26.
- Berkovic, S. F., Andermann, F., Olivier, A., Ethier, R., Melanson, D., Robitaille, Y., Feindel, W. (1991). Hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy demonstrated by magnetic resonance imaging. *Annals of Neurology*, *29*(2), 175–82.
- Bhakuni, D. S., Bittner, M., Marticorena, C., Silva, M., Weldt, E., & Hoeneisen, M. (1976). Screening of Chilean plants for anticancer activity. I. *Lloydia*, *39*(4), 225–43.
- Bloss, E. B., & Hunter, R. G. (2010). Hippocampal kainate receptors. *Vitamins and Hormones*, *82*, 167–84.
- Bonizzi, G., & Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology*, *25*(6), 280–8.
- Briggs, S. W., & Galanopoulou, A. S. (2011). Altered GABA signaling in early life epilepsies. *Neural Plasticity*, *2011*, 527605.
- Brown J. E. (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal*, *330* (Pt 3), 1173.
- Buckmaster, P. S. (2012). *Mossy Fiber Sprouting in the Dentate Gyrus*. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. National Center for Biotechnology Information (US).
- Capovilla, G., Beccaria, F., Beghi, E., Minicucci, F., Sartori, S., & Vecchi, M. (2013). Treatment of convulsive status epilepticus in childhood: recommendations of the Italian League Against Epilepsy. *Epilepsia*, *54 Suppl 7*, 23–34.
- Carriedo, S. G., Sensi, S. L., Yin, H. Z., & Weiss, J. H. (2000). AMPA exposures induce mitochondrial Ca (2+) overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(1), 240–50.

- Céspedes, C. L., Alarcon, J., Avila, J. G., & El-Hafidi, M. (2010). Anti-inflammatory Activity of *Aristotelia chilensis* Mol. (Stuntz) (Elaeocarpaceae). *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromaticas*, 9(6), 432–439.
- Crofford, L. J. (1997). COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *The Journal of Rheumatology. Supplement*, 49, 15–9.
- Choi, J., & Koh, S. (2008). Role of brain inflammation in epileptogenesis. *Yonsei Medical Journal*, 49(1), 1–18.
- Darstein, M., Petralia, R. S., Swanson, G. T., Wenthold, R. J., & Heinemann, S. F. (2003). Distribution of kainate receptor subunits at hippocampal mossy fiber synapses. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(22), 8013–9.
- De Simoni, M. G., Perego, C., Ravizza, T., Moneta, D., Conti, M., Marchesi, F., Vezzani, A. (2000). Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *The European Journal of Neuroscience*, 12(7), 2623–33.
- DeLorenzo, R. J., Pellock, J. M., Towne, A. R., & Boggs, J. G. (1995). Epidemiology of status epilepticus. *Journal of Clinical Neurophysiology : Official Publication of the American Electroencephalographic Society*, 12(4), 316–25.
- DeLorenzo, R. J., Towne, A. R., Pellock, J. M., & Ko, D. (1992). Status epilepticus in children, adults, and the elderly. *Epilepsia*, 33 Suppl 4, S15–25.
- Delpire, E., & Mount, D. B. (2002). Human and murine phenotypes associated with defects in cation-chloride cotransport. *Annual Review of Physiology*, 64, 803–43.
- Diaz, A., Mendez-Armenta, M., Galván-Arzate, S., Manjarrez, J., Nava-Ruiz, C., Santander, I., Ríos, C. (2013). Antioxidant, anticonvulsive and neuroprotective effects of dapsone and phenobarbital against kainic acid-induced damage in rats. *Neurochemical Research*, 38(9), 1819–27.
- Ding, R., Asada, H., & Obata, K. (1998). Changes in extracellular glutamate and GABA levels in the hippocampal CA3 and CA1 areas and the induction of glutamic acid decarboxylase-67 in dentate granule cells of rats treated with kainic acid. *Brain Research*, 800(1), 105–13.
- Dos Santos, N. F., Arida, R. M., Filho, E. M., Priel, M. R., & Cavalheiro, E. A. (2000). Epileptogenesis in immature rats following recurrent status epilepticus. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 32(1), 269–76.
- Echeverri R, N. P., & Mockus S, I. (2008). Nuclear factor kB (NF-KB): signalosoma and its importance in cancer and inflammatories diseases. *Revista de La Facultad de Medicina*, 56(2), 133–146.

Engel J Jr, Pedley TA. *What is epilepsy? In: Epilepsy: A comprehensive textbook.* Philadelphia: Lippincott-Raven, 2005: 1–11.

Engel, J. (2001). Intractable epilepsy: definition and neurobiology. *Epilepsia*, 42 Suppl 6, 3.

Engel, J. (2004). Models of focal epilepsy. *Supplements to Clinical Neurophysiology*, 57, 392–9.

Engel, J. (2006). ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy Research*, 70 Suppl 1, S5–10.

Esclapez, M., Hirsch, J. C., Ben-Ari, Y., & Bernard, C. (1999). Newly formed excitatory pathways provide a substrate for hyperexcitability in experimental temporal lobe epilepsy. *The Journal of Comparative Neurology*, 408(4), 449–60.

Farrow, B., & Evers, B. M. (2002). Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surgical Oncology*, 10(4), 153–69.

Friedman, A., & Heinemann, U. (2012). *Role of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Epileptogenesis.* *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies.*

Friedman, L. K., Pellegrini-Giampietro, D. E., Sperber, E. F., Bennett, M. V, Moshé, S. L., & Zukin, R. S. (1994). Kainate-induced status epilepticus alters glutamate and GABA_A receptor gene expression in adult rat hippocampus: an in situ hybridization study. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(5 Pt 1), 2697–707.

Fujita, T., Nolan, G. P., Liou, H. C., Scott, M. L., & Baltimore, D. (1993). The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes & Development*, 7(7B), 1354–63.

Gloire, G., Legrand-Poels, S., & Piette, J. (2006). NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical Pharmacology*, 72(11), 1493–505.

Gorter, J. A., van Vliet, E. A., Aronica, E., Breit, T., Rauwerda, H., Lopes da Silva, F. H., & Wadman, W. J. (2006). Potential new antiepileptogenic targets indicated by microarray analysis in a rat model for temporal lobe epilepsy. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(43), 11083–110.

Griffin, W. S. T., & Mrak, R. E. (2002). Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 72(2), 233–8.

Hauser, W. A. (1994). The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. *Epilepsia*, 35 Suppl 2, S1–6.

- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes & Development*, 18(18), 2195–224.
- Hla, T., & Neilson, K. (1992). Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(16), 7384–8.
- Holmes, G. L. (1997). Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic. *Epilepsia*, 38(1), 12–30.
- Holopainen, I. E. (2008). Seizures in the developing brain: cellular and molecular mechanisms of neuronal damage, neurogenesis and cellular reorganization. *Neurochemistry International*, 52(6), 935–47.
- Jankowsky, J. L., & Patterson, P. H. (2001). The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Progress in Neurobiology*, 63(2), 125–49.
- Jensen, F. E., & Baram, T. Z. (2000). Developmental seizures induced by common early-life insults: short- and long-term effects on seizure susceptibility. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 6(4), 253–7.
- Kim, E. J., Lee, J. E., Kwon, K. J., Lee, S. H., Moon, C. H., & Baik, E. J. (2001). Differential roles of cyclooxygenase isoforms after kainic acid-induced prostaglandin E (2) production and neurodegeneration in cortical and hippocampal cell cultures. *Brain Research*, 908(1), 1–9.
- Kok, K., Geering, B., Vanhaesebroeck, B., Vanhaesebroeck, B., al., et, Stephens, L. R. Backer, J. M. (2009). Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(3), 115–127.
- Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y., Stallings, W. C. (1997). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384(6610), 644–8.
- Laflamme, N., Echchannaoui, H., Landmann, R., & Rivest, S. (2003). Cooperation between toll-like receptor 2 and 4 in the brain of mice challenged with cell wall components derived from gram-negative and gram-positive bacteria. *European Journal of Immunology*, 33(4), 1127–38.
- Lauri, S. E., Bortolotto, Z. A., Bleakman, D., Ornstein, P. L., Lodge, D., Isaac, J. T., & Collingridge, G. L. (2001). A critical role of a facilitatory presynaptic kainate receptor in mossy fiber LTP. *Neuron*, 32(4), 697–709.
- Lee, H. K., Seo, Y. J., Choi, S. S., Kwon, M. S., Shim, E. J., Lee, J. Y., & Suh, H. W. (2005). Role of gamma-aminobutyric acid B (GABA (B)) receptors in the regulation of kainic acid-induced cell death in mouse hippocampus. *Experimental & Molecular Medicine*, 37(6), 533–45.

Leppik, I. E. (2004). Zonisamide: chemistry, mechanism of action, and pharmacokinetics. *Seizure*, *13 Suppl 1*, S5–9; discussion S10.

Liu, Y.-C. (2004). Ubiquitin ligases and the immune response. *Annual Review of Immunology*, *22*, 81–127.

Losi, G., Cammarota, M., & Carmignoto, G. (2012). The role of astroglia in the epileptic brain. *Frontiers in Pharmacology*, *3*, 132.

Lothman, E. W., & Collins, R. C. (1981). Kainic acid induced limbic seizures: metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. *Brain Research*, *218(1-2)*, 299–318.

Lukasiuk K, Pitkänen A (2009). *Seizure-induced gene expression. Encyclopedia of basic epilepsy research*. Oxford: Academic Press, Reino Unido.

Marcheselli, V. L., & Bazan, N. G. (1996). Sustained induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by seizures in hippocampus. Inhibition by a platelet-activating factor antagonist. *The Journal of Biological Chemistry*, *271(40)*, 24794–9.

Maroso, M., Balosso, S., Ravizza, T., Iori, V., Wright, C. I., French, J., & Vezzani, A. (2011). Interleukin-1 β biosynthesis inhibition reduces acute seizures and drug resistant chronic epileptic activity in mice. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *8(2)*, 304–15.

Maroso, M., Balosso, S., Ravizza, T., Liu, J., Aronica, E., Iyer, A. M., Vezzani, A. (2010). Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nature Medicine*, *16(4)*, 413–9.

Matsuda, H., Kagerura, T., Toguchida, I., Ueda, H., Morikawa, T., & Yoshikawa, M. (2000). Inhibitory effects of sesquiterpenes from bay leaf on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: structure requirement and role of heat shock protein induction. *Life Sciences*, *66(22)*, 2151–7.

Mazarati, A. M., Baldwin, R. A., Sankar, R., & Wasterlain, C. G. (1998). Time-dependent decrease in the effectiveness of antiepileptic drugs during the course of self-sustaining status epilepticus. *Brain Research*, *814(1-2)*, 179–85.

Mizrahi, E. M., & Kellaway, P. (1987). Characterization and classification of neonatal seizures. *Neurology*, *37(12)*, 1837–44.

Mouri, G., Jimenez-Mateos, E., Engel, T., Dunleavy, M., Hatazaki, S., Paucard, A., Henshall, D. C. (2008). Unilateral hippocampal CA3-predominant damage and short latency epileptogenesis after intra-amygdala microinjection of kainic acid in mice. *Brain Research*, *1213*, 140–51.

Murakami, S., Takemoto, T. & Shimizu, Y., 1953. Studies on the effective principles of *Diagenea simplex* Aq., I: separation of the effective fraction by liquid chromatography. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 73, pp.1026–1028.

Nadler, J. V. (1981). Minireview. Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sciences*, 29(20), 2031–42.

Neligan, A., & Shorvon, S. D. (2010). Frequency and prognosis of convulsive status epilepticus of different causes: a systematic review. *Archives of Neurology*, 67(8), 931–40.

Netea, M. G., Wijmenga, C., & O’Neill, L. A. J. (2012). Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol*, 13(6), 535–542.

Nicklin, M. J., Weith, A., & Duff, G. W. (1994). A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics*, 19(2), 382–384.

Nicklin, M. J., Weith, A., & Duff, G. W. (1994). A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics*, 19(2), 382–4.

Odontuya, G., Hoult, J. R. S., & Houghton, P. J. (2005). Structure-activity relationship for antiinflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. *Phytotherapy Research : PTR*, 19(9), 782–6.

Ojeda, J., Jara, E., Molina, L., Parada, F., Burgos, R. A., Hidalgo, M. A., & Hancke, J. L. (2011). Effects of *Aristotelia chilensis* berry juice on cyclooxygenase 2 expression, NF-kB, NFAT, ERK1/2 and PI3K/Akt activation in colon cancer cells. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 10(6), 543–552.

Panayiotopoulos, C. P. (2012). The new ILAE report on terminology and concepts for the organization of epilepsies: critical review and contribution. *Epilepsia*, 53(3), 399–404.

Penkowa, M., Molinero, A., Carrasco, J., & Hidalgo, J. (2001). Interleukin-6 deficiency reduces the brain inflammatory response and increases oxidative stress and neurodegeneration after kainic acid-induced seizures. *Neuroscience*, 102(4), 805–18.

Pérez, G & Trueba, P. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 22(1), 48–57.

Pernot, F., Dorandeu, F., Beaup, C., & Peinnequin, A. (2010). Selection of reference genes for real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in hippocampal structure in a murine model of temporal lobe epilepsy with focal seizures. *Journal of Neuroscience Research*, 88(5), 1000–8.

Pitkänen, A. (2010). Therapeutic approaches to epileptogenesis--hope on the horizon. *Epilepsia*, 51 Suppl 3, 2–17.

Pitkänen, A., Schwartzkroin, P. & Moshé, S.L., 2006. Models of Seizures and Epilepsy.
Plotkin, M. D., Snyder, E. Y., Hebert, S. C., & Delpire, E. (1997). Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *Journal of Neurobiology*, 33(6), 781–95.

Polascheck, N., Bankstahl, M., & Löscher, W. (2010). The COX-2 inhibitor parecoxib is neuroprotective but not antiepileptogenic in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Experimental Neurology*, 224(1), 219–33.

Pomerantz, J. L., & Baltimore, D. (2002). Two pathways to NF-kappaB. *Molecular Cell*, 10(4), 693–5.

Pool-Zobel, B. L., Bub, A., Schröder, N., & Rechkemmer, G. (1999). Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells. *European Journal of Nutrition*, 38(5), 227–34.

Rahman A., Fazal F., Greensill J., Ainley K., Parish J.H., Hadi S.M. (1992) Strand scission in DNA induced by idetary flavonoids: role of Cu(I) and oxygen free radicals and biological consequences of escission. *Molecular Cell Biochemistry* 111:3-9.

Rahman, A., Shahabuddin, Hadi, S. M., Parish, J. H., & Ainley, K. (1989). Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu (II): role of Cu (I) and oxygen free radicals. *Carcinogenesis*, 10(10), 1833–1839.

Ransohoff, R. M., Kivisäkk, P., & Kidd, G. (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nature Reviews. Immunology*, 3(7), 569–81.

Raol, Y. H., Lapidés, D. A., Keating, J. G., Brooks-Kayal, A. R., & Cooper, E. C. (2009). A KCNQ channel opener for experimental neonatal seizures and status epilepticus. *Annals of Neurology*, 65(3), 326–36.

Ravizza, T., Balosso, S., & Vezzani, A. (2011). Inflammation and prevention of epileptogenesis. *Neuroscience Letters*, 497(3), 223–30.

Ravizza, T., Rizzi, M., Perego, C., Richichi, C., Velísková, J., Moshé, S. L., Vezzani, A. (2005). Inflammatory response and glia activation in developing rat hippocampus after status epilepticus. *Epilepsia*, 46 Suppl 5, 113–7.

Reyes M., Vasquez, K., Ovalle-Marin, A., Fuentes, F., Parra, C., Quitral, V., Garcia-Diaz, D. F. (2015). Chilean native fruit extracts inhibit inflammation linked to the pathogenic interaction between adipocytes and macrophages. *Journal of Medicinal Food*, 18(5), 601–8.

- Reynolds, I. J., & Hastings, T. G. (1995). Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(5 Pt 1), 3318–27.
- Riazi, K., Galic, M. A., & Pittman, Q. J. (2010). Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: cytokines and brain excitability. *Epilepsy Research*, 89(1), 34–42.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Kaila, K. (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*, 397(6716), 251–5.
- Rivest, S. (2003). Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain, Behavior, and Immunity*, 17(1), 13–9.
- Robel, S., & Sontheimer, H. (2015). Glia as drivers of abnormal neuronal activity. *Nature Neuroscience*, 19(1), 28–33.
- Romijn, H. J., Hofman, M. A., & Gramsbergen, A. (1991). At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Human Development*, 26(1), 61–7.
- Rossetti, A. O., & Kaplan, P. W. (2010). Seizure semiology: an overview of the “inverse problem”. *European Neurology*, 63(1), 3–10.
- Rubio Donnadiou F., Reséndiz Aparicio J.C., Sentías Madrid H., Alonso Venegas M.A., Salgado Lujambio P. (2007). *Epilepsia. Programa prioritario de epilepsia*. 1ª Edición, Ediciones Del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México D.F.
- Sahu, S. C., Gray, G. C., Ames, B. N., Ames, B. N., Birnboim, H. C., Brown, J. P., Sciences, U. N. A. of. (1993). Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin. *Cancer Letters*, 70(1-2), 73–79.
- Sahu, S. C., Gray, G. C., Ames, B. N., Bellomo, G., Vairetti, M., Stivala, L., Liehr, J. G. (1996). Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Letters*, 104(2), 193–196.
- Sahu, S., & Gray, G., (1997). Lipid peroxidation and dna damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. *Food and Chemical Toxicology*, 35(5), 443–447.
- Schwob, J. E., Fuller, T., Price, J. L., & Olney, J. W. (1980). Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neuroscience*, 5(6), 991–1014.

- Shinnar, S., Pellock, J. M., Moshé, S. L., Maytal, J., O'Dell, C., Driscoll, S. M., DeLorenzo, R. J. (1997). In whom does status epilepticus occur: age-related differences in children. *Epilepsia*, 38(8), 907–14.
- Shorvon, S. (2005). The classification of status epilepticus. *Epileptic Disorders: International Epilepsy Journal with Videotape*, 7(1), 1–3.
- Singh, R. K., & Gaillard, W. D. (2009). Status epilepticus in children. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 9(2), 137–44.
- Smith, C. J., Sun, D., Hoegler, C., Roth, B. S., Zhang, X., Zhao, G., Hintze, T. H. (1996). Reduced gene expression of vascular endothelial NO synthase and cyclooxygenase-1 in heart failure. *Circulation Research*, 78(1), 58–64.
- Smith, M. A. L., Marley, K. A., Seigler, D., Singletary, K. W., & Meline, B. (1999). Bioactive Properties of Wild Blueberry Fruits. *Journal of Food Science*, Vol, 65(2).
- Sperk, G., Lassmann, H., Baran, H., Kish, S. J., Seitelberger, F., & Hornykiewicz, O. (1983). Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes. *Neuroscience*, 10(4), 1301–15.
- Sperk, G., Lassmann, H., Baran, H., Seitelberger, F., & Hornykiewicz, O. (1985). Kainic acid-induced seizures: dose-relationship of behavioural, neurochemical and histopathological changes. *Brain Research*, 338(2), 289–95.
- Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Jentsch, T. J., & Hübner, C. A. (2004). Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride. *The Journal of Comparative Neurology*, 468(1), 57–64.
- Strauss, K. I., Barbe, M. F., Marshall, R. M., Raghupathi, R., Mehta, S., & Narayan, R. K. (2000). Prolonged cyclooxygenase-2 induction in neurons and glia following traumatic brain injury in the rat. *Journal of Neurotrauma*, 17(8), 695–711.
- Swann, J. W., Brady, R. J., & Martin, D. L. (1989). Postnatal development of GABA-mediated synaptic inhibition in rat hippocampus. *Neuroscience*, 28(3), 551–61.
- Takaesu, G., Surabhi, R. M., Park, K.-J., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., & Gaynor, R. B. (2003). TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *Journal of Molecular Biology*, 326(1), 105–15.
- Takemiya, T., Maehara, M., Matsumura, K., Yasuda, S., Sugiura, H., & Yamagata, K. (2006) Prostaglandin E2 produced by late induced COX-2 stimulates hippocampal neuron loss after seizure in the CA3 region. *Neuroscience Research*, 56(1), 103–10.

Tchekalarova, J., Kubová, H., & Mares, P. (2010). Effects of early postnatal caffeine exposure on seizure susceptibility of rats are age- and model-dependent. *Epilepsy Research*, 88(2-3), 231–8.

Tsoyi, K., Park, H. Bin, Kim, Y. M., Chung, J. Il, Shin, S. C., Lee, W. S., Kim, H. J. (2008). Anthocyanins from Black Soybean Seed Coats Inhibit UVB-Induced Inflammatory Cyclooxygenase-2 Gene Expression and PGE₂ Production through Regulation of the Nuclear Factor- κ B and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 8969–8974.

Tyzio, R., Represa, A., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., Gozlan, H., & Aniksztejn, L. (1999). The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(23), 10372–82.

Utrecht, J., Zahid, N., Shear, N. H., & Biggar, W. D. (1988). Metabolism of dapsone to a hydroxylamine by human neutrophils and mononuclear cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 245(1), 274–9.

Velíšek, L., Kubová, H., Velísková, J., Mares, P., & Ortová, M. (1992). Action of antiepileptic drugs against kainic acid-induced seizures and automatisms during ontogenesis in rats. *Epilepsia*, 33(6), 987–93.

Vezzani, A., Friedman, A., & Dingledine, R. J. (2013). The role of inflammation in epileptogenesis. *Neuropharmacology*, 69, 16–24.

Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M. M., Bartfai, T., Marinovich, M. (2003). Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(25), 8692–700.

Volpe, J., 2008. *Neurobiology of the new born*. Saunders Elsevier Inc., 5^a Edición, Philadelphia, EUA.

Wang, X., Li, X., Currie, R. W., Willette, R. N., Barone, F. C., & Feuerstein, G. Z. (2000). Application of real-time polymerase chain reaction to quantitate induced expression of interleukin-1beta mRNA in ischemic brain tolerance. *Journal of Neuroscience Research*, 59(2), 238–46.

Wang, Y., Zhan, L., Zeng, W., Li, K., Sun, W., Xu, Z. C., & Xu, E. (2011). Downregulation of hippocampal GABA after hypoxia-induced seizures in neonatal rats. *Neurochemical Research*, 36(12), 2409–16.

Williams, A. J., Dave, J. R., & Tortella, F. C. (2006). Neuroprotection with the proteasome inhibitor MLN519 in focal ischemic brain injury: Relation to nuclear factor κ B (NF- κ B),

inflammatory gene expression, and leukocyte infiltration. *Neurochemistry International*, 49(2), 106–112.

Wozel, G., & Blasum, C. (2014). Dapsone in dermatology and beyond. *Archives of Dermatological Research*, 306(2), 103–24.

Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., & Karin, M. (1997). The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*, 91(2), 243–52.

Zeise, M. L., Espinoza, J., Morales, P., & Nalli, A. (1997). Interleukin-1beta does not increase synaptic inhibition in hippocampal CA3 pyramidal and dentate gyrus granule cells of the rat in vitro. *Brain Research*, 768(1-2), 341–4.

Zhang, X.-M., & Zhu, J. (2011). Kainic Acid-induced neurotoxicity: targeting glial responses and glia-derived cytokines. *Current Neuropharmacology*, 9(2), 388–98.

Zhu, L., Lovinger, D., & Delpire, E. (2005). Cortical neurons lacking KCC2 expression show impaired regulation of intracellular chloride. *Journal of Neurophysiology*, 93(3), 1557–68.

Zuidema, J., Hilbers-Modderman, E. S., & Merkus, F. W. (1986). Clinical pharmacokinetics of dapsone. *Clinical Pharmacokinetics*, 11(4), 299–315.