



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO NEUROPROTECTOR A CORTO PLAZO DEL FENIL
BUTIRATO DE SODIO SOBRE EL DAÑO NEURONAL
INDUCIDO CON ÁCIDO KAÍNICO EN RATAS NEONATAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

Gallardo Flores Carla Elizabeth



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Sandra Adela Orozco Suárez
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.
2019**



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos de Alumna

Gallardo Flores Carla Elizabeth

044 55 5432 0792

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

312035783

2. Datos del Tutor

Dra

Sandra Adela

Orozco

Suárez

3. Sinodal 1

Dra.

Fabiola

Hernández

Vázquez

4. Sinodal 2

Dr.

José Carmen

Luna

Muñoz

5. Sinodal 3

Dr.

Christian Humberto

Guerra

Araiza

6. Sinodal 4

Dra.

Alette

Ortega

Gómez

7. Datos del Trabajo escrito

EFFECTO NEUROPROTECTOR A CORTO PLAZO DEL FENIL BUTIRATO DE SODIO SOBRE EL DAÑO NEURONAL INDUCIDO CON ÁCIDO KAÍNICO EN RATAS NEONATAS

53 p.

2019

DEDICATORIA

A:

Mi mamá Catalina E. Flores y a mi papá Juan M. Gallardo, quienes siempre me han apoyado incondicionalmente y me han brindado todas las herramientas necesarias para llegar hasta donde estoy e incluso más lejos.

Mi familia, los Flores Maldonado que, aún cuando se encuentran lejos, me brindan su apoyo y su amor.

Mis amigos y amigas que hacen de mis días emocionantes y se encuentran conmigo en las buenas y en las malas.

AGRADECIMIENTOS

A:

Mi tutora y primera mentora, la Dra. Sandra A. Orozco por su voto de confianza, su apoyo y su dirección.

Carmen Baltazar y Angélica Vega por su apoyo y tiempo para el desarrollo de la parte experimental

Mis compañeros de laboratorio sin quienes mi tiempo en el laboratorio no habría sido tan agradable.

Los miembros del jurado, por darse el tiempo de leer este trabajo y sus consejos.

CONTENIDO

1.	RESUMEN/ SUMMARY	9
2.	INTRODUCCIÓN	11
3.	ANTECEDENTES	14
3.1	ESTADO EPILÉPTICO EN LA ETAPA NEONATAL	14
3.2	ESTADO EPILÉPTICO	17
3.3	EPILEPTOGÉNESIS	18
3.4	MODELOS EN ANIMALES	18
3.4.1	MODELO DE ÁCIDO KAÍNICO	20
3.4.2	NEUROINFLAMACIÓN EN LA EPILEPTOGÉNESIS	21
3.4.3	CICLOOXIGENASA 2	23
3.5	ANTIPILEPTOGÉNESIS	26
3.5.1	TRATAMIENTOS	26
3.5.2	FENIL BUTIRATO DE SODIO	28
4.	JUSTIFICACIÓN	31
5.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
6.	HIPÓTESIS	32
7.	OBJETIVOS	32
7.1	OBJETIVO GENERAL	32
7.2	OBJETIVO PARTICULAR	32
8.	MÉTODOS	33
8.1	DISEÑO EXPERIMENTAL	33
8.2	UNIVERSO DE ESTUDIO	35

8.2.1	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	35
8.2.2	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	35
8.2.3	CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	35
8.2.4	VARIABLES DEPENDIENTES	36
8.2.5	VARIABLES INDEPENDIENTES	36
8.3	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	36
8.3.1	GRUPO CONTROL	37
8.3.2	GRUPO CONTROL DE ÁCIDO KAÍNICO	37
8.3.3	GRUPO ÁCIDO KAÍNICO + CELECOXIB	37
8.3.4	GRUPO CONTROL CELECOXIB	38
8.3.5	GRUPO CONTROL ÁCIDO KAÍNICO + FENIL BUTIRATO	38
8.4	INDUCCIÓN DEL ESTADO EPILÉPTICO	38
8.5	WESTERN BLOT	39
8.5.1	EXTRACCIÓN DE TEJIDO	39
8.5.2	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	40
8.5.3	ELECTROFORESIS	40
8.5.4	INMUNOBLOT	40
8.5.5	DETERMINACIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA	41
8.5.6	ESTUDIO A CORTO PLAZO DE LA DOSIS EFECTIVA	41
8.6	TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	41
8.6.1	FLUOROJADE	41

8.6.2	INMUNOFLUORESCENCIA	42
8.6.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
8.7	CONSIDERACIONES ÉTICAS	44
9.	RESULTADOS	45
9.1	DETERMINACIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA POR WESTERN BLOT	45
9.2	INMUNOFLUORESCENCIA	47
9.3	EVALUACIÓN DE DAÑO NEURONAL POR FLUOROJADE	52
10.	DISCUSIÓN	56
11.	CONCLUSIONES	59
12.	BIBLIOGRAFÍA	60

ABREVIATURAS

AK	Ácido kaínico
Clbx	Celcoxib
Cox-1	Ciclooxigenasa 1
Cox-2	Ciclooxigenasa 2
FBS	Fenil butirato de sodio
GABA	Ácido γ -aminobutírico
IL	Interleucina
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
PGs	Prostaglandinas
PN	Postnatal
SE	Status epilepticus (Estado epiléptico)
SNC	Sistema nervioso central
TLE	Epilepsia del lóbulo temporal

1. RESUMEN

Numerosos estudios han demostrado que la neuroinflamación juega un papel sumamente importante en el desarrollo de patologías crónicas neurodegenerativas. Particularmente, se ha demostrado que la sobreexpresión en la molécula proinflamatoria ciclooxigenasa 2 (Cox-2) está asociada al daño neuronal en modelos de ratas en desarrollo. De igual forma, se ha reportado que inhibidores selectivos de Cox-2 como el celecoxib, ofrecen un efecto neuroprotector posterior al daño ocasionado por crisis convulsivas en ratas adultas y en pacientes. Sin embargo, su uso en neonatos e infantes no ha sido aprobado debido a los efectos secundarios que causa en el desarrollo del sistema cardiovascular. En este trabajo nosotros encontramos que el Fenil Butirato de Sodio (FBS) administrado intraperitonealmente a una dosis de 50mg/kg posterior a un evento convulsivo ocasionado por ácido kaínico es capaz de reducir la expresión de Cox-2 en el hipocampo dorsal en un modelo de ratas en desarrollo de la cepa Sprague Dawley. Además de ello, también concluimos que el FBS confiere un efecto neuroprotector posterior al evento convulsivo en zonas CA1, CA3 y Giro Dentado del hipocampo dorsal.

SUMMARY

Several studies had reported that neuroinflammation has an important role in the development in neurological chronic diseases. Particularly, it has been demonstrated that the overexpression of the proinflammatory molecule Cyclooxygenase 2 (Cox-2) is associated to the neurological damage in neonatal rats model. Furthermore, it has also been reported that selective inhibitors of Cox-2, such as Celecoxib can offer a neuroprotective effect after the brain damage caused by convulsive crisis in adult rats and in human patients. Nevertheless its use in minors had been unauthorized because it causes secondary effects over the development of the cardiovascular system. In this work, we found that the dose of 50mg/kg of the drug Sodium Fenil Butirate (FBS) administered intraperitoneally after the brain damage caused by Kainic Acid is able to reduce Cox-2 expression in the dorsal Hippocampus of neonatal Sprague Dawley rats. Furthermore we concluded that administration of FBS after the convulsive crisis has a neuroprotective effect over areas CA1, CA3, and Dental Girus of dorsal hippocampus.

2. INTRODUCCIÓN

El término de crisis convulsivas hace referencia a la interrupción temporal de la función cerebral debido a la excesiva actividad excitatoria de las neuronas corticales (ILAE, 2016). Estas crisis convulsivas son más comunes durante el periodo neonatal y se manifiestan debido a anormalidades en la actividad neurológica (Who, 2018). Las descargas anormales cerebrales pueden ser causadas por anomalías en el microambiente tales como isquemia e hipoxia, y por otras causas como hemorragia intracraneal, meningitis, malformación cerebral, anormalidades metabólicas, entre otras (Pressler, 2012).

Es altamente probable que la actividad convulsiva ocurrida durante las crisis neonatales genere un daño neuronal que pueda evolucionar a complicaciones crónicas como epilepsia y alteraciones en el desarrollo cerebral. Por lo tanto, para la disminución, o incluso la erradicación, de estas complicaciones, la intervención farmacológica oportuna resulta de suma importancia.

Numerosos estudios han demostrado que las crisis convulsivas y la neuroinflamación son dos eventos relacionados. Se ha propuesto que las crisis convulsivas son exacerbadas por acción de moléculas proinflamatorias. Entre ellas se encuentra la ciclooxigenasa 2 (Cox-2) (Dey et al., 2016).

La Cox 2, es una molécula que participa en la síntesis de prostaglandinas, y que, en condiciones normales, presenta una expresión basal en sistema nervioso. Adicionalmente, también se ha observado que la inhibición selectiva de esta

ciclooxigenasa confiere un efecto neuroprotector próximo a un evento convulsivo (Flower, 2003; Strauss, 2008). De esta manera, muchos fármacos inhibidores selectivos de la Cox-2 son empleados como tratamientos anticonvulsivos. Entre los más usados se encuentran el Celecoxib y el Rofecoxib (Flower, 2003).

El uso de estos anticonvulsivos se encuentra aprobado por la FDA para adultos. Sin embargo, su uso no es permitido en neonatos pues se ha demostrado que estos fármacos pueden ocasionar daño en el desarrollo del sistema cardiovascular (Funk et al., 2007). Es por esto que estudios recientes han centrado la atención en la búsqueda de un fármaco inhibidor de la Cox-2, que no presente daños secundarios severos en el desarrollo de neonatos y que no comprometa la función neurológica.

Para esta búsqueda, se han utilizado numerosos modelos que permitan inducir, y por lo tanto estudiar el *status epilepticus* (SE), los procesos de epileptogénesis y otros desórdenes. Un ejemplo de ellos es el modelo de Ácido Kaínico. El Ácido Kaínico es una molécula excitatoria análoga al L-glutamato y un agonista de los receptores iónicos asociados a Kainato. Su administración intraperitoneal induce a los pocos minutos un *status epilepticus* en animales inmaduros. Es por ello que este modelo resulta práctico y útil para el estudio del daño neuronal asociado a episodios convulsivos (Lévesque et al., 2013). Adicionalmente, este modelo permite también la evaluación de fármacos candidatos como anticonvulsivos o antiinflamatorios tales como el Fenil Butirato de Sodio (FBS).

El FBS es una sal sódica de Fenil butirato que se deriva de la cadena corta de ácido graso de Fenil butirato. El uso de esta molécula está aprobado en pacientes con desórdenes en el ciclo de la urea y otros estudios ha demostrado que puede inhibir de manera reversible las desacetilasas de histonas 1 y 2. Adicionalmente, también se ha demostrado que el FBS suprime moléculas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno, y por lo tanto tiene el potencial de reducir el daño ocasionado por el proceso de neuroinflamación (Roy et al., 2012).

Es por ello que nosotros proponemos que el FBS puede ser un fármaco capaz de reducir la expresión de Cox-2 que pueda emplearse en ratas en desarrollo y que probablemente confiera un efecto neuroprotector. En este trabajo, se pretende determinar el efecto del Fenil Butirato de Sodio sobre la expresión de la ciclooxigenasa 2 y evaluar si éste confiere un efecto neuroprotector próximo a la inducción de daño asociado a *status epilepticus* inducido por ácido kaínico en ratas neonatas.

3. ANTECEDENTES

3.1 Estado epiléptico en la etapa neonatal

Debido a los cambios intensos presentes en el cerebro en desarrollo: la proliferación, la migración celular y la actividad excitatoria elevada para la formación y la eliminación de procesos dendríticos, el cerebro inmaduro es particularmente propenso a convulsiones y al daño ocasionado por éstas. (Holmes, et al., 2002). En la etapa neonatal (periodo que comprende desde el nacimiento hasta los 28 días de vida) las crisis convulsivas resultan potencialmente perjudiciales para el desarrollo y la estructuración cerebral, dado que la actividad neuronal durante esta etapa es crítica para el establecimiento de las sinapsis (Volpe, 2008).

Las crisis convulsivas en neonatos se manifiestan debido a anormalidades en la actividad neurológica. En mayor grado, estas crisis son causadas por anormalidades en el medio intracelular como isquemia e hipoxia, y en menor grado, por otras causas tales como hemorragia intracraneal, meningitis, malformación cerebral, anormalidades metabólicas, trauma craneoencefálico, hiperexcitabilidad en respuesta a agentes nocivos, infecciones, y otras (Holmes et al., 2002; Pressler, 2012).

El cerebro en desarrollo presenta una mayor cantidad de sinapsis, mayor densidad de espinas dendríticas, y una alta expresión de canales iónicos excitatorios, así como transportadores que promueven la excitación neuronal. Adicionalmente, durante esta etapa, los neurotransmisores normalmente inhibidores cumplen

funciones excitatorias necesarias durante el proceso de desarrollo. (Ben-Ari et al., 1989; Holmes et al., 2002).

Un ejemplo de esto es el ácido gamma aminobutírico (GABA), uno de los neurotransmisores principales del sistema nervioso central y cuya función, al actuar en los receptores GABA_A acoplados a canales de Cl⁻, puede ser tanto excitatoria como inhibitoria dependiendo de las condiciones del microambiente. En el cerebro adulto, GABA es predominantemente inhibitorio; sin embargo, durante el desarrollo cerebral, este neurotransmisor tiene un papel despolarizante. Esta característica excitatoria es necesaria para el crecimiento dendrítico, permite la supervivencia y la estructuración cerebral. Sin embargo, dicha función excitatoria también hace al cerebro inmaduro más susceptible a las crisis convulsivas.

Esta función dual del GABA está determinada por la concentración del ión cloruro (Cl⁻) y dicha concentración está regulada a su vez por contranportadores como Na-K-Cl (NKCC1) y K-Cl (KCC2). Mientras que NKCC1 transporta Cl⁻ al interior cuando la concentración del ión es baja en el medio intracelular; KCC2 lo transporta al exterior cuando la concentración de Cl⁻ es alta. De esta manera, NKCC1 permite que el receptor de GABA_A tenga una función despolarizante y KCC2 tenga el efecto contrario y funcione como hiperpolarizante (Ben-Ari et al., 2007; Blaesse et al., 2009; Hyde et al., 2011).

En etapas tempranas, la expresión de NKCC1 predomina en las neuronas gabaérgicas, y conforme el desarrollo cerebral continúa, KCC2 aumenta. La

diferencia temporal en la expresión de NKCC1/KCC2 coincide con el intercambio en la función de GABA de un neurotransmisor excitatorio a uno inhibitorio (Owens et al., 2002).

El flujo de Cl^- y la función excitatoria de GABA en neurona inmaduras conducen a la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, así como a los receptores de glutamato NMDA con función de canal (Ben-Ari et al., 2007).

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio por excelencia del SNC y es el responsable principal de las crisis convulsivas por su actividad de reforzarla y sostenerla. Durante la liberación de glutamato se desencadenan procesos fisiopatológicos y estado de hiperexcitación (Barker-Haliski & Steve White, 2015; Ghasemi et al., 2011)

El N-metil-D-aspartato (NMDA) es un receptor de glutamato con actividad de canal iónico capaz de transportar Na^+ y Ca^{2+} . La actividad de canal se encuentra bloqueada en condiciones basales por Mg^{2+} y se activa cuando el bloqueo de Mg^{2+} es retirado por despolarización celular. Cuando el receptor es activado, el Ca^{2+} entra a la célula y aumenta su concentración al interior de ésta (Choi et al., 2008; Ghasemi et al., 2011; Zhou et al., 2015)

Tanto la función excitatoria de GABA como la activación de los receptores NMDA conducen a la entrada de Ca^{2+} a la célula, lo cual es necesario para proceso

neuronales, pero también promueve un estado de hiperexcitabilidad que puede causar excitotoxicidad y muerte celular (Ghasemi, 2011)..

Los NMDARs pueden ser responsables por la muerte celular y por la potenciación a largo plazo. Es por ello que estos han sido estudiados como blanco terapéutico contra enfermedades como epilepsia y esclerosis hipocampal (Ghasemi, 2011).

3.2 ESTADO EPILÉPTICO

Aunque no existe una definición universalmente aceptada para el estado epiléptico (SE), en 1993 la Liga Internacional Contra la Epilepsia, lo definió de la siguiente forma:

“Una situación clínica caracterizada por una continua actividad convulsiva (generalizada o parcial, con o sin manifestaciones motoras) que dura más de 20 minutos o que presenta crisis recurrentes a intervalos muy cortos (menores a 1 minuto) estableciendo así una condición epiléptica persistente.” (Chen, 2017)

Aunque aún se encuentra en debate si esta definición aplica también para los recién nacidos, este estado es una condición importante que requiere un tratamiento rápido para así prevenir la muerte neuronal como resultado de la excesiva activación. Además de ello, se ha reportado que el SE en neonatos rara vez es generalizado y es difícil reconocer las diferencias en cuanto etiología y anomalías entre pacientes con SE y crisis recurrentes (Chen, 2017; Haut et al., 2004; Pisani et al., 2007)

En recién nacidos, el estado epiléptico es principalmente generado por daño agudo, y la etiología es muy similar a la de las crisis convulsivas: condiciones de hipoxia e isquemia; desórdenes metabólicos heredables; infecciones; y hemorragias (Pisani et al., 2007).

Finalmente, algunos de los procesos fisiológicos que tienen que ver con el SE son: alteraciones en el ambiente iónico celular, desbalance en la concentración de iones Ca, K y Na que resultan en una alteración en la permeabilidad celular; la alta actividad excitatoria; cambios estructurales ocasionados por el daño neuronal; estrés oxidativo, que propagan la actividad epiléptica; y la disfuncionalidad en la barrera hematoencefálica que puede resultar de la neuroinflamación (Neligan, 2010).

3.3 EPILEPTOGÉNESIS

La epileptogénesis es el proceso por el cual el cerebro previamente normal es alterado y tiende a la generación de actividad eléctrica anormal que puede favorecer convulsiones crónicas (Goldberg, 2013). La epileptogénesis puede iniciarse en cualquier punto de la vida de un individuo y también se debe a numerosos factores. Este proceso puede incluir cualquier acción o característica biológica que ocasionen o favorezcan la presencia de convulsiones no provocadas. Estas acciones o características biológicas incluyen alteraciones moleculares y anatómicas, así como alteraciones a nivel de circuito como muerte celular o desregulación de algún canal iónico o un receptor de neurotransmisor (Goldberg, 2013).

El proceso de epileptogénesis puede clasificarse en tres diferentes fases:

1. La aparición de un daño neuronal o algún evento neuronal anormal.
2. Un periodo latente durante el cual ocurren los cambios neuronales debido al daño o disturbio previamente ocurrido. Durante este periodo, los cambios ocurridos transforman al cerebro normal e un cerebro epiléptico.
3. Epilepsia crónica.

Es durante la etapa latente cuando ocurre la adquisición de la epilepsia y por lo tanto es en este punto cuando se usan las intervenciones que puedan prevenir el desarrollo de epilepsia.

Las diferencias entre convulsiones, epilepsia y epileptogénesis radica en la acción de los anticonvulsivos clásicos. Estos pueden finalizar las convulsiones, así como prevenir o disminuir la aparición de futuras convulsiones en individuos epilépticos, sin embargo, son completamente inefectivas para prevenir el proceso de epileptogénesis (Goldberg, 2013).

3.4 MODELOS EN ANIMALES

Actualmente existen numerosos modelos farmacológicos para el estudio de la epilepsia, los procesos epileptogénicos y las crisis convulsivas. Dichos estudios permiten imitar las crisis observadas en humanos y han resultado muy útiles para la evaluación de tratamientos que actualmente se emplean, o bien, tienen el

potencial de emplearse en humanos. Dichos modelos toman en cuenta las siguientes características:

1. Duración del protocolo para inducir crisis epilépticas.
2. Agente causante de la crisis (sustancias químicas, estímulos físicos, alteraciones metabólicas, mutaciones).
3. Tipo de actividad epiléptica generada (crisis focales o generalizadas, tónicas, clónicas, etc).

Entre algunos los modelos farmacológicos empleados para el estudio de procesos epileptogénicos se encuentra el pentilentetrazol, kindling amigdalino y ácido kaínico.

3.4.1 MODELO DE ÁCIDO KAÍNICO

El modelo de epileptogénesis del Ácido kaínico (AK) fue desarrollado por Ben-Ari en 1978. Este modelo es extensamente utilizado para estudios de epilepsia y de epileptogénesis, el cual se asemeja a un modelo de epilepsia del lóbulo temporal (TLE) presente en humanos. Adicionalmente, éste modelo ha contribuido al entendimiento de los mecanismos moleculares, celulares y farmacológicos observados durante la epileptogénesis (Ben-Ari et al., 1978; Lévesque, 2013)

El AK es un análogo cíclico al L-glutamato y es un agonista inotrópico de receptores glutamatérgicos ionotrópicos a kainato (Lévesque, 2013). Estos receptores se encuentran diferencialmente expresados en principalmente en

hipocampo; sin embargo también pueden ser encontrados en amígdala, en la corteza entorrinal, en el ganglio basal y en el cerebelo (Bloss, 2010).

Este modelo es ampliamente utilizado en ratas inmaduras para el estudio de la epilepsia pues induce actividad convulsiva si el AK es administrado de manera intraperitoneal. El AK ocasiona las convulsiones a partir de despolarizaciones que inician en el sistema límbico y pueden causar un estado epiléptico. Este estado produce alteraciones neuronales que promueven el proceso de epileptogénesis que dan lugar a crisis epilépticas y posteriormente a muerte celular (Velíšek et al., 1992).

3.4.2 NEUROINFLAMACIÓN EN LA EPILEPTOGÉNESIS

La inflamación es una secuencia de respuestas biológicas ante cambios homeostáticos que se caracteriza por el enrojecimiento, la hinchazón, presencia fiebre, dolor y pérdida de la función. Puede clasificarse en: inflamación aguda, necesaria para resolver o destruir el insulto que la desencadenó y que generalmente desaparece en pocos días; e inflamación crónica, que es una prolongación anormal de la inflamación aguda y que es de gran importancia pues puede causar daño al tejido y puede resultar en condiciones serias como artritis, enfermedades vasculares, diabetes y enfermedades cardíacas y pulmonares (Dey et al., 2016).

El SNC se encuentra inmunológicamente privilegiado debido a la estrecha constricción de la barrera hematoencefálica que regula la entrada de moléculas de

cierto tamaño. La inflamación en SNC o neuroinflamación, es caracterizada por la presencia de citosinas y mediadores inflamatorios que en condiciones normales no son detectables. Estas moléculas son secretadas por las células del sistema inmune en respuesta a diferentes entidades patológicas por células del parénquima cerebral (células de la microglía, astrocitos y neuronas) y por células de la barrera hematoencefálica y plexo coroideo (Vezzani et al., 2013; Vezzani, 2005).

Los mediadores de la neuroinflamación más conocidos pueden dividirse en tres tipos: en enzimas proinflamatorias como COX-2, NOS inducible y NOX; en citosinas como IL-1 β , IL-6 y TNF- α ; así como en factores de crecimiento como TGF- β y BDNF. Interesantemente, se ha encontrado que la desregulación en la expresión de estas moléculas proinflamatorias se encuentran asociadas a numerosas condiciones neurológicas como epilepsia (Dey et al., 2016).

Estudios en pacientes y en modelos experimentales epilépticos han demostrado que estos mediadores se encuentran alterados. Adicionalmente, otros estudios indican que las crisis convulsivas dan lugar a un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, lo cual puede intensificar y perpetuar la neuroinflamación por la extravasación de leucocitos y de moléculas proinflamatorias de los vasos hacia el parénquima cerebral (Gorter et al., 2015; Marchi et al., 2007).

Por el lado contrario, se ha descubierto que la neuroinflamación crónica, producida por numerosos factores como enfermedades autoinmunes, encefalitis e infecciones, puede causar crisis convulsivas (Dey et al., 2016).

En conclusión, es posible afirmar que la neuroinflamación y las crisis convulsivas son dos procesos estrechamente relacionados entre sí. En un inicio, las convulsiones prolongadas pueden ocasionar y mantener neuroinflamación crónica. Mientras que la inflamación crónica, independientemente de su etiológica, puede generar y exacerbar las crisis.

3.4.3 CICLOOXIGENASA 2

Las cicloxigenasas son una familia de enzimas que catalizan el metabolismo del ácido araquidónico a prostaglandinas (PGs). En mamíferos y aves existen dos isoformas de cicloxigenasas que han sido caracterizadas: Cox-1, que es constitutivamente expresada en la mayoría de los tejidos para mantener las condiciones fisiológicas estables y Cox-2 que es, en cambio, inducida por citosinas proinflamatorias y factores de crecimiento que participan en el proceso inflamatorio (Kim, 2006). Sin embargo, se ha observado, que en condiciones normales, Cox-2 presenta un nivel de expresión basal en neuronas del hipocampo y de otras partes del cerebro (Kaufmann, 1996; Yamagata, 1993)

El gen de la ciclooxygenasa 2 se encuentra en el primer cromosoma y mide aproximadamente 8kb. El RNAm es de aproximadamente 4.1 a 4.5kb y codifica para una proteína de 68kDa (Kosaka et al., 1994; Kraemer et al., 1992; Otto, 1995)

La Cox-2 se expresa de manera basal en las neuronas del hipocampo y en otras regiones del cerebro. Esta molécula ha recibido particular atención pues se ha observado que sus niveles de expresión en neuronas del hipocampo y en astrocitos aumentan después de una actividad convulsiva (Hirst et al., 1999; Yamagata et al., 1993). Los estudios sugieren que un aumento en la expresión de Cox-2 resulta en el aumento en la producción de prostaglandinas observada en tejidos inflamados (Turini, 2002).

En SNC, Cox-2 es un mediador en la neuroinflamación y se ha observado que su activación promueve daño neuronal en modelos de ratas con TLE mientras que la inhibición del aumento de Cox-2 reduce la muerte neuronal, lo cual sugiere que inhibidores de la Cox-2 confieren un efecto protector (Rojas et al., 2014). La participación de la Cox-2 en la neuroinflamación y la epileptogénesis está relacionada con la activación y secreción de otras moléculas (figura 1).

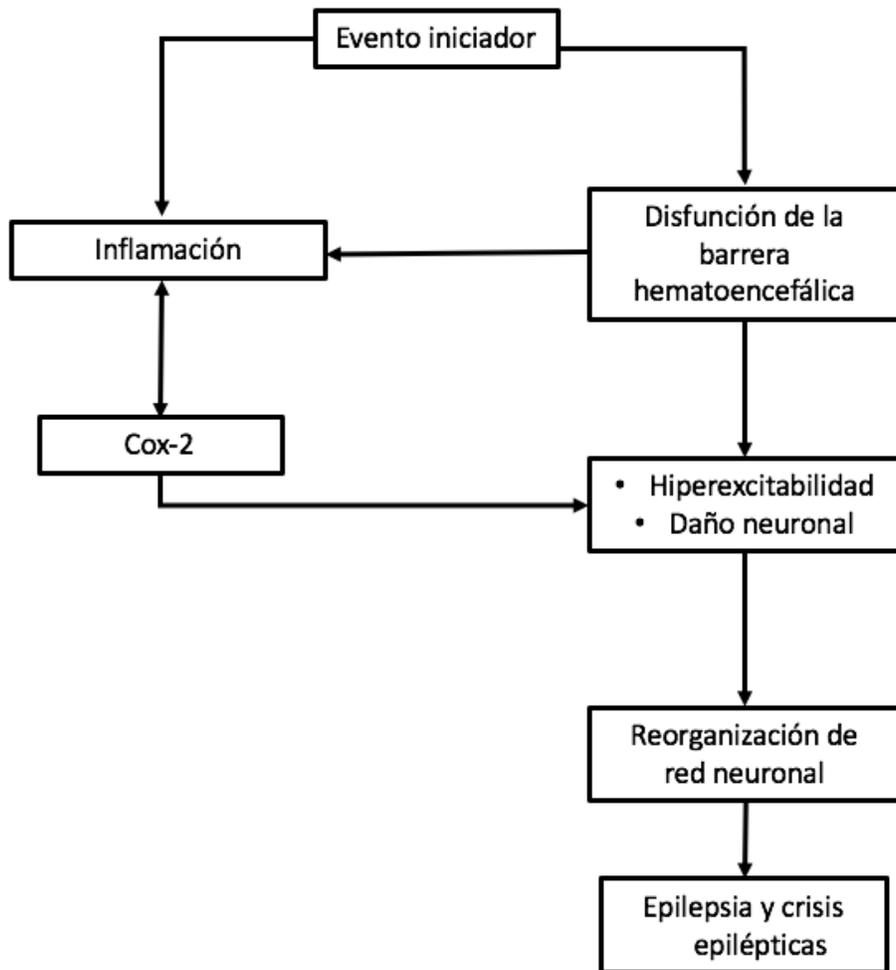


Figura 1: Participación de la Cox-2 en la neuroinflamación. En la vía de la neuroinflamación y el desarrollo de crisis epilépticas, Cox2 actúa como mediador proinflamatorio. Alta expresión de Cox2 e inflamación pueden resultar en inducción de la hiperexcitabilidad, la reorganización neuronal con efectos neurológicos importantes.

3.5 ANTIEPILEPTOGÉNESIS

Actualmente, no existe una cura para la epilepsia. Los pacientes epilépticos son tratados con anticonvulsivos, los cuales ayudan en la disminución de crisis convulsivas, más no las previenen por completo. Por otro lado, los tratamientos antiepileptogénicos son aquellos que evitan el establecimiento de la epilepsia. Sin embargo, la búsqueda por un fármaco que detenga completamente el establecimiento de la epilepsia todavía continúa y debe considerar la fase y el estadio del individuo en el cual se administre. Por otro lado, los tratamientos antiepileptogénicos son utilizados para prevenir el establecimiento neuronal propenso a epilepsia.

3.5.1 TRATAMIENTOS

El primer reto en la búsqueda de un fármaco que pueda ser utilizado en contra de condiciones neurológicas debe ser que este pueda cruzar la barrera hematoencefálica. Es por ello que la mayoría de fármacos empleados como tratamiento contra la epilepsia y otras enfermedades deben ser moléculas pequeñas, que puedan ingresar a SNC, que sean estables y no sean inmunológicos y fáciles de caracterizar y modificar.

Es por ello que las moléculas pequeñas resultan elementos prometedores como tratamientos de enfermedades del SNC. Entre algunos de ellos, se ubican

moléculas selectivas capaces de inhibir los mediadores proinflamatorios presentes en numerosas enfermedades neurodegenerativas.

Entre algunas de estas moléculas, se encuentran los inhibidores selectivos de la Cox-2 como celecoxib, aspirina, etoricoxib, indometacina, nimesulida, NS398, paracoxib, rofecoxib, entre otros. Las cuales pueden disminuir la expresión de cox-2 y por ende atenuar las crisis convulsivas y el daño que éstas generan. (Rojas et al., 2014; Turini & Dubois, 2002)

Parecería entonces que el uso de dichas moléculas durante el periodo latente de la epilepsia podría frenar las crisis y las consecuencias de éstas. Sin embargo, muchas moléculas pueden generar daños secundarios, lo cual limita las dosis y la edad en la que pueden ser administrados. Un claro ejemplo es el celecoxib, el inhibidor selectivo de la Cox-2 cuyo uso en neonatos no es permitido debido al daño que causa en el desarrollo del sistema cardiovascular (Funk & FitzGerald, 2007).

3.5.2 FENIL BUTIRATO DE SODIO

El Fenil butirato de sodio (FBS) es una sustancia cristalina de color blanco que tiene un fuerte sabor salado. Este compuesto es soluble en agua y en metanol, pero prácticamente insoluble en acetona y éter dietílico. Su nombre químico es ácido 4-fenilbutírico y su fórmula es $C_{10}H_{11}O_2Na$, con un peso de 186g/mol (Figura 2) (National Center For Biotechnology, 2018).

Clínicamente, el FBS es utilizado como un vehículo alternativo para la excreción de nitrógeno debido a que este es rápidamente metabolizado en fenilacetato. El cual es un compuesto metabólicamente activo capaz de conjugarse con la glutamina vía la acetilación para formar fenilacetilglutamina, la cual es excretada por los riñones y es molecularmente comparable con la urea. Debido a esto, el FBS, es un fármaco originalmente empleado para tratar niños con desórdenes en el ciclo de la urea (Brusilow et al., 1984; Maestri ,et al., 1996).

En cuanto a la farmacocinética del FBS, se sabe que, en adultos, el pico de concentración en plasma ocurre dentro de una hora, con una dosis única de 5 gramos. Sin embargo, se desconoce si la ingesta de alimentos tenga algún efecto sobre la absorción del fármaco. Los metabolitos del FBS no han sido caracterizados por completo, pero se sabe que puede metabolizarse a fenilacetato y subsecuentemente a fenilacetilglutamina como se mencionó con anterioridad. Siendo el hígado y los riñones lo sitios con mayor metabolización del FBS.

Posterior a la administración oral de 5g, los niveles de fenilbutirato y fenilacetato son detectados después de los 15 y 30 minutos de administración. Los parámetros de Cmax ($\mu\text{g/mL}$), Tmax (horas) y la vida media (horas) del fenilbutirato fueron de 195, 1.00, y 0.76 y del fenilacetato de 45.3, 3.55, y 1.29 respectivamente. Es importante mencionar que la farmacocinética del FBS en neonatos y niños no ha sido completamente caracterizada hasta el momento.

En varios estudios se ha demostrado que el FBS es un compuesto con potencial de aplicación clínica, pues además de contribuir en desórdenes del ciclo de la urea: en *Drosophila* se observó que puede alargar la vida (Kang et al.,2002); contribuye de manera positiva al tratamiento de atrofia muscular (Andreassi et al., 2004), es capaz de inducir la apoptosis en carcinoma pancreático y puede tener un papel importante en la comunicación intracelular, así como un inhibidor reversible de las histonas desacetilasas I y II, entre otras aplicaciones (Iannitti, 2012).

En 2012, se documentó que el FBS es también un fármaco capaz de suprimir moléculas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno en células gliales y generó protección parcial y mejoría motora en modelos animales con Parkinson inducido (Roy et al., 2012).

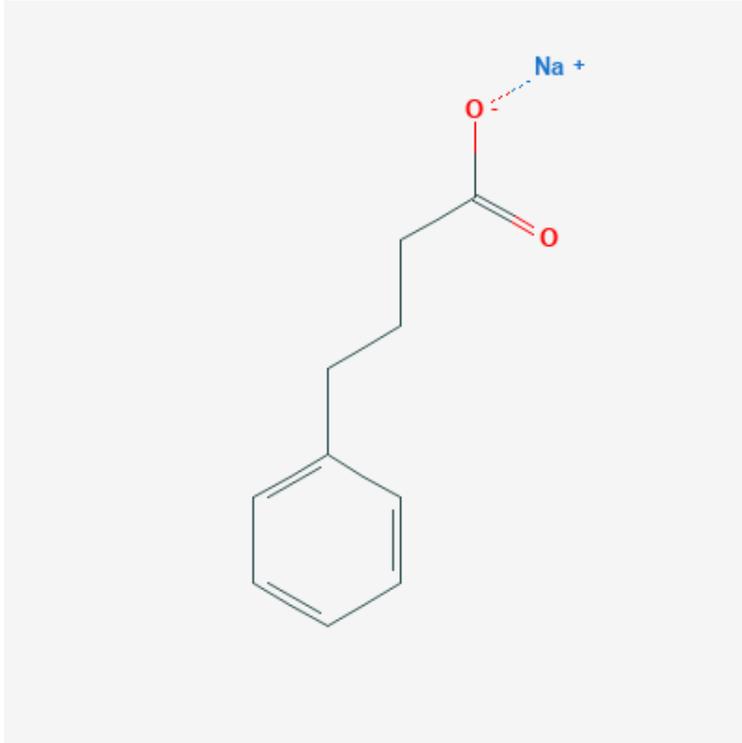


Figura 2: Representación del

Fenil butirato de Sodio. El

FBS es un compuesto soluble en agua con peso de 186 g/mol.

Debido a la necesidad de encontrar un fármaco que pueda inhibir o disminuir la expresión de la molécula proinflamatoria Cox-2 para prevenir el daño causado por las crisis convulsivas, y que

además pueda ser aplicado en neonatos sin causar daños secundarios, nosotros proponemos al FBS como un candidato viable.

4. JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento no se ha encontrado un fármaco que prevenga el proceso de epileptogénesis, conociendo que después de un evento convulsivo induce la producción de moléculas proinflamatorias como la Cox-2, se debería considerar un blanco terapéutico; sin embargo, no existen inhibidores de la Cox-2 que puedan ser empleados en neonatos y que no causen efectos secundarios graves en el resto del desarrollo del mismo. En este trabajo, evaluaremos si el Fenil Butirato de Sodio puede funcionar como un inhibidor de la Cox-2, así como el efecto neuroprotector que éste provea próximo al daño asociado a las crisis convulsivas inducidas por un modelo de ácido kaínico en ratas jóvenes.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que los fármacos actuales empleados en adultos como inhibidores de la Cox-2 pueden causar efectos secundarios en el desarrollo del sistema cardiovascular en neonatos o niños, es necesaria la búsqueda de fármacos alternativos que puedan ser empleados en etapas tempranas y posteriormente a un evento convulsivo. Es por ello que, en este trabajo, pretendemos investigar si el FBS es capaz de reducir la expresión de la proteína inflamatoria Cox-2 y proveer un efecto protector en ratas de 12 días postnatal después de un evento convulsivo.

6. HIPÓTESIS

La administración del fármaco FBS disminuirá la expresión de la Cox-2 y tendrá un efecto neuroprotector posterior a la inducción del daño ocasionado por las crisis convulsivas y el *status epilepticus* inducido por AK en ratas de 12 días PN.

OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la expresión de Cox-2 y el efecto neuroprotector a corto plazo del FBS posterior al daño inducido por el estado epiléptico en un modelo de ácido kaínico en ratas inmaduras.

6.2 OBJETIVO PARTICULAR

- Determinar la dosis efectiva 50 del fármaco FBS que reduzca significativamente la expresión de Cox-2 en ratas neonatas de 12 días post-natal posterior a un evento convulsivo.
- Desarrollo del modelo de Ácido Kaínico en ratas de la cepa Sprague Dawley para inducir un estado epiléptico.
- Evaluar el efecto neuroprotector del FBS sobre la muerte neuronal inducida por AK en ratas a los 12 días postnatal

7. MÉTODOS

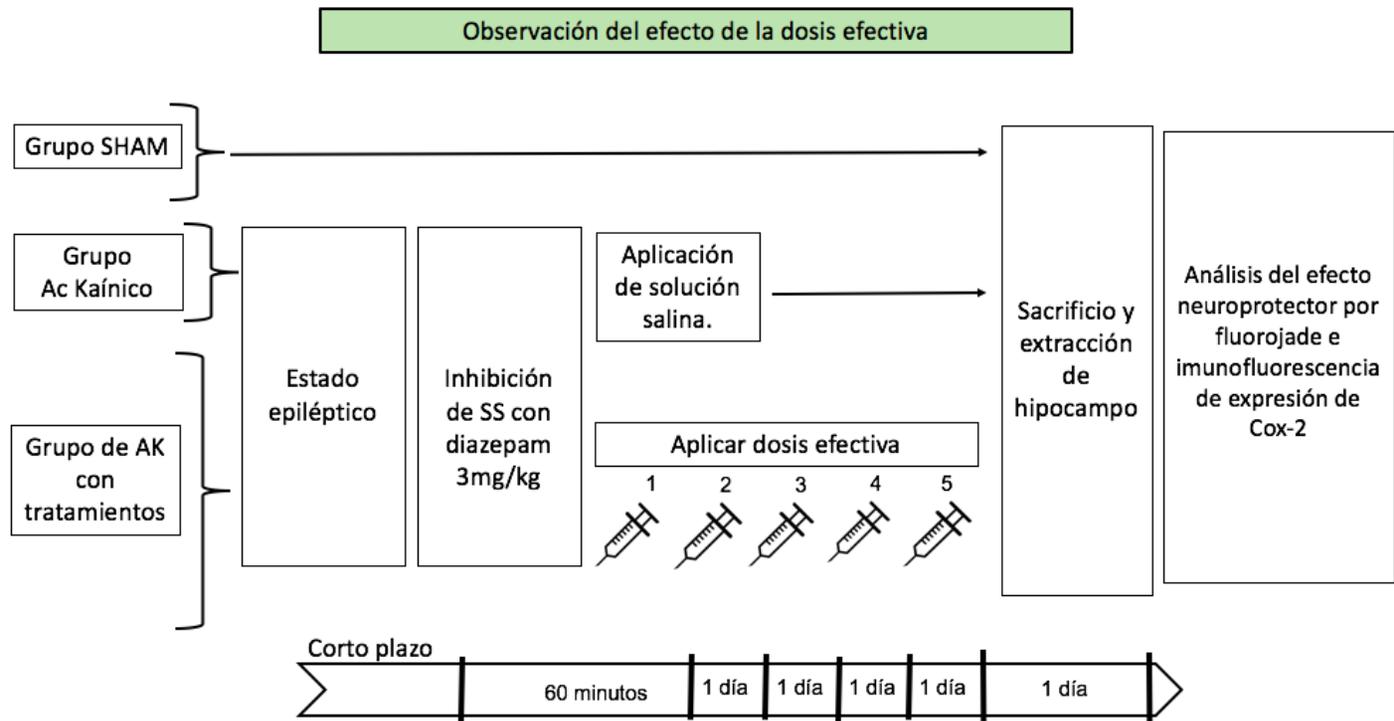
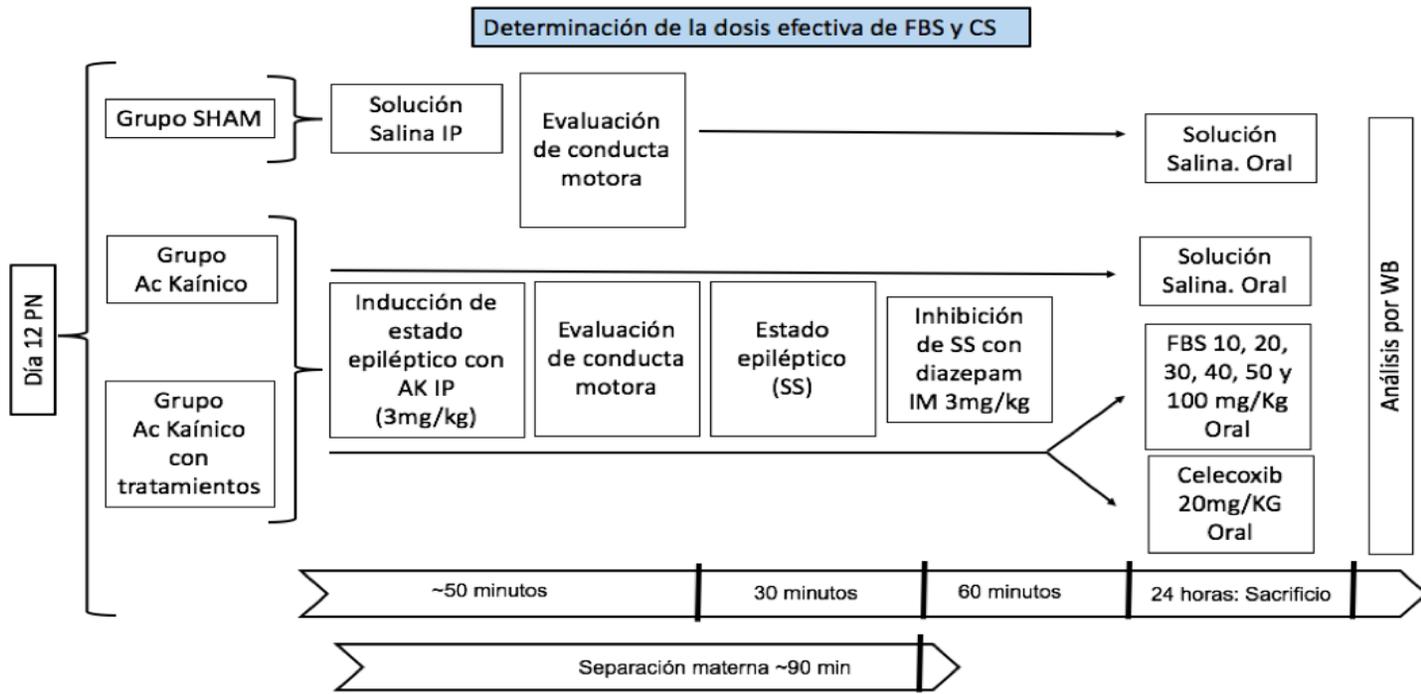
7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Determinación de la dosis efectiva de FBS

Para observar el efecto del FBS sobre la expresión de la Cox-2 se indujo estado epiléptico en ratas de 12 días de edad, empleando un modelo de AK. Se emplearon tres ratas por concentración: 10, 20, 30, 40 y 50 mg/Kg y se sacrificaron al día siguiente. Se extrajeron los cerebros y se obtuvo el hipocampo. Los hipocampos de las tres ratas de cada concentración fueron procesados para la evaluación de Cox-2 por medio de WB para la determinación de la dosis efectiva.

Evaluación del efecto protector de la dosis efectiva en hipocampo

Una vez determinada la dosis efectiva de FBS, se estudió el efecto protector que ésta confería, administrando esta dosis durante 5 días.



7.2 UNIVERSO DE ESTUDIO

Ratas de la cepa *Sprague Dawley*

7.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Ratas machos de la cepa *Sprague Dawley*.
- Ratas de apariencia sana y con las características morfológicas acordes a su periodo de desarrollo postnatal.
- Ratas de 12 días de edad con un peso de 22 a 27 gramos.
- Ratas que cubran la edad requerida al término del experimento.

7.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Ratas enfermas o que no cuenten con las características morfológicas acordes a su periodo de desarrollo postnatal (PN).
- Ratas que no cumplan con la edad y el peso requeridos al inicio del experimento.
- Ratas que no desarrollen respuesta convulsiva con la dosis determinada del Ácido Kaínico (AK)

7.2.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Ratas que mueran antes de cumplir con la fecha programada de experimentación, tratamiento y evaluación.

7.2.4 VARIABLES DEPENDIENTES

- Estado Epiléptico
- Expresión de Cox-2
- Celecoxib
- Número de Neuronas preservadas en hipocampo dorsal y ventral.
- Número de neuronas en proceso de degeneración en hipocampo dorsal y ventral.
- Gliosis

7.2.5 VARIABLES INDEPENDIENTES

- Concentración de Ácido Kaínico
- Concentración Celecoxib
- Solución Salina
- Fenil Butirato de Sodio

7.3 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

- Se utilizaron ratas sanas de 12 PN de la sepa *Sprague Dawley* cuyo peso fuera de 22 a 27 gramos. Las ratas nacieron y fueron crecidas en el bioterio con ciclos de luz y oscuridad 12x12 horas y a temperatura de 20 a 22°C.
- Se les proporcionó alimento ilimitado materno hasta los 21 días de edad; y posteriormente alimento de la Fórmulab Diet #5008 a libre demanda.

- Para determinar la dosis efectiva del Fenil Butirato, se utilizó una n=27 para cada tratamiento, divididas en siete grupos de tres ratas por tratamiento. El efecto se estudió a corto plazo.

7.3.1 GRUPO CONTROL

Tratados con solución salina:

- 12 días. Una única administración oral al día 12 PN. Sacrificados al 13 PN.
- 16 días: Administración a partir de los 12 días de edad, cada 24 horas, hasta cumplir 5 días. Sacrificados en el día 16.

7.3.2 GRUPO CONTROL DE ÁCIDO KAÍNICO

Tratados con dosis convulsivas de Ácido Kaínico puro disuelto en solución salina (3mg/kg).

- 12 días. Una única administración oral al día 12 PN. Sacrificados al 13 PN.
- 16 días: Administración a partir de los 12 días de edad, cada 24 horas, hasta cumplir 5 días. Sacrificados en el día 16.

7.3.3 GRUPO ÁCIDO KAÍNICO + CELECOXIB

Tratados con Ácido Kaínico puro disuelto en solución salina (3mg/kg) y Celecoxib activo puro disuelto en solución salina (20mg/kg)

- 12 días. Una única administración oral al día 12 PN. Sacrificados al 13 PN.
- 16 días: Administración a partir de los 12 días de edad, cada 24 horas, hasta cumplir 5 días. Sacrificados en el día 16.

7.3.4 GRUPO CONTROL CELECOXIB

Tratados con Celecoxib activo puro disuelto en solución salina, (20mg/kg)

- 12 días. Una única administración oral al día 12 PN. Sacrificados al 13 PN.
- 16 días: Administración a partir de los 12 días de edad, cada 24 horas, hasta cumplir 5 días. Sacrificados en el día 16.

7.3.5 GRUPO CONTROL ÁCIDO KAÍNICO + FENIL BUTIRATO

Tratados con Ácido Kaínico puro disuelto en solución salina (3mg/kg) y Fenil Butirato en solución inyectable a diferentes dosis: 10mg/kg, 20mg/kg, 30mg/kg, 40mg/kg y 50mg/kg.

- 12 días. Una única administración oral al día 12 PN. Sacrificados al 13 PN.
- 16 días: Administración a partir de los 12 días de edad, cada 24 horas, hasta cumplir 5 días. Sacrificados en el día 16.

7.4 INDUCCIÓN DEL ESTADO EPILÉPTICO

Para la inducción del estado epiléptico, las ratas neonatas fueron separadas de la madre y se les permitió aclimatarse durante una hora en la habitación de procedimientos sin la compañía materna. Posteriormente, se aplicó ácido kaínico (3mg/kg) de manera intraperitoneal y se utilizó la escala establecida por Raol et al. para determinar el inicio del estado epiléptico: (Raol, Lapidés, Keating, Brooks-Kayal, & Cooper, 2009).

- FASE I: Se detiene la conducta exploratoria y la rata permanece inmóvil.
- FASE II: Se presentan sacudidas corporales y sobresaltos.
- FASE III: Se presentan rascados recurrentes con las extremidades inferiores (mioclonías unilaterales)
- FASE IV: Se presentan rascados recurrentes con las extremidades inferiores y superiores (mioclonías bilaterales)
- FASE V: Comienza la pérdida de la postura e intentos de incorporarse sin éxito. La frecuencia en los rascados aumenta y entre cada uno de ellos hay una separación menor a 1 minuto. Si esta fase permanece durante más de cinco minutos, se determina que la rata ha entrado a estado epiléptico establecido.

Una vez alcanzada la fase V, las ratas se mantuvieron en estado epiléptico durante 30 minutos y posteriormente se administró diazepam 2 mg/kg para detener las convulsiones. Se regresaron las ratas con la madre y 60 minutos después se administraron con las dosis de Fenil Butirato Sodio. Posteriormente, las ratas se sacrificaron a las 24 horas.

7.5 WESTERN BLOT

7.5.1 EXTRACCIÓN DE TEJIDO

Los animales fueron sacrificados por decapitación y el cerebro fue extraído. Se tomó el hipocampo y se preservó en solución salina a -70°C.

7.5.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

El tejido fue homogeneizado con 100ug de buffer de lisis con urea y posteriormente fue centrifugado a 15,000 rpm a -4°C. Se obtuvo el sobrenadante y se realizó la cuantificación por el Método de Bradford para determinar la cantidad de proteína a utilizar en la electroforesis.

7.5.3 ELECTROFORESIS

Se separaron las proteínas de acuerdo al peso molecular en un gel de bis-acrilamida al 10% que fue corrido a 80 volts. Posteriormente, las proteínas separadas por peso fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 18 volts.

Se bloquearon dichas membranas durante dos horas en una disolución al 10% de leche Svelty disuelta en PBS-TWEEN para evitar la unión inespecífica. Finalizado este tiempo, se realizaron dos lavados con PBS-TWEEN y un lavado más con PBS sin Tween.

7.5.4 INMUNOBLOT

Luego de los lavados, las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-Cox2 hecho en ratón. La incubación con el anticuerpo primario fue de 48 horas y pasado este tiempo se realizaron otros tres lavados de cinco minutos, dos con PBS-TWEEN y uno más sin TWEEN.

Se incubó con el anticuerpo secundario durante una hora y se realizaron tres lavados con PBS-Tween y uno sin TWEEN. Finalmente, las membranas se revelaron mediante quimioluminiscencia.

7.5.5 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA

Posterior a la inducción del estado epiléptico con ácido kaínico, se administraron las distintas dosis de 10, 20, 30, 40 y 50 mg/Kg de FBS en tres ratas por dosis y se analizó la expresión de la cox-2 en los grupos por medio de Western Blot. Adicionalmente, también se emplearon los controles SHAM y Ácido kaínico.

7.5.6 ESTUDIO A CORTO PLAZO DE LA DOSIS EFECTIVA

El estudio a corto plazo constó de la administración de la dosis efectiva de FBS de las ratas neonatas cada 24 horas durante 5 días. Posteriormente, las ratas se sacrificaron al sexto día y se extrajo el hipocampo para análisis de inmunofluorescencia y fluorojade.

7.6 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

7.6.1 FLUOROJADE

El fluoro-jade es un derivado de la fluoresceína ampliamente utilizado para tinciones histológicas en neuronas en proceso degenerativo. Esta tinción permite reconocer estructuras neuronales dañadas y es un método confiable para detectar compuestos que puedan ocasionar daño neurológico (Schmuck & Kahl, 2009). En este trabajo, la tinción fue realizada en cortes congelados, los cuales fueron rehidratados con alcohol básico (20 ml de hidróxido de sodio al 5% en 80ml de

etanol absoluto) durante 5 minutos. Posteriormente, fueron colocados en etanol al 70% y en agua destilada durante 2 minutos. Después, se les colocó permanganato de potasio diluido al 0.06% en agua destilada durante 20 minutos. Una vez finalizado este tiempo, se realizó la tinción de Fluorojade al 0.0001% diluido en ácido acético; la solución final fue al 0.01% (80 µl FJ al de la solución madre en 2ml de ácido acético) durante 24 horas. Posteriormente se lavaron las laminillas con agua destilada y se montaron con resina sintética. Las muestras se analizaron en un microscopio de epifluorescencia y se evaluó el daño en hipocampo por medio de conteo celular.

7.6.2 INMUNOFLUORESCENCIA

Para la tinción por inmunofluorescencia se rehidrataron los cortes con buffer de sales de fosfato (PBS) al 1X durante 5 minutos y se bloqueó con suero de cabra normal (1ul de suero por cada 200ml de PBS) durante 20 minutos. Posteriormente, se incubó con los anticuerpos primarios contra Cox-2 y NMDA (10ul de anticuerpo en 200ul de PBS) durante 24 horas a 4°C. Una vez finalizado este periodo, se lavaron los cortes 2 veces durante 5 minutos cada vez con PBS, se procedió a incubar con los anticuerpos secundarios respectivos (1:200 de Alexa® en PBS) durante 3 horas y se lavaron nuevamente los cortes con. Se utilizó Hoechst para la tinción del núcleo, dejándolo incubar durante 3 minutos (2ul por cada 5ml de PBS 1x) y se remojó en PBS.

Finalmente se cubrieron con Vectashield (Vector Lab) para ser analizadas con un microscopio confocal invertido (Nikon Ti Eclipse equipado con un sistema de

imagen A1 con un software NIS Elements v.4.5.0, los colorantes fueron excitados en un modo secuencial usando una línea de láseres: 403 nm Hoescht, 488 nm Alexa 488 Invitrogen Life; y 563 nm Alexa 546 Invitrogen life technologies.). De cada espécimen se tomaron 6 fotografías de cada región del hipocampo. Con el programa FIJI-Image J, se analizaron las imágenes mediante la cuantificación de la densidad de fluorescencia en píxeles, se cuantificó la intensidad de los píxeles del canal verde correspondiente a la Alexa 488. Se obtuvo un histograma a partir de los valores de intensidad contenidas en mapa de bits de la imagen, el cual se calibró previamente la intensidad y la escala espacial para establecer los valores de intensidad como la intensidad integrada de cada imagen. La densidad óptica se determinó en relación con el grupo de control y se expresa como píxeles/mm².

7.6.3 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. De acuerdo a los datos, se escogió una prueba no paramétrica de Dunnett's. Para encontrar las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se utilizó la prueba *post hoc* Tukey. Considerando un intervalo de confianza del 95 % y un error $\alpha = 0.05$.

7.7 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los animales de laboratorio empleados para este trabajo fueron tratados con el mejor cuidado, siguiendo las normas establecidas por la NOM-062-ZOO-1999. Para la administración del fármaco se sustituyó la sonda gástrica por una pipeta para disminuir el daño, asegurándose que las dosis fueran ingeridas completamente. El sacrificio fue por decapitación y realizada por investigadores con experiencia, una manera útil para la obtención de los tejidos y rápida para la evasión de sufrimiento para el animal. Se empleó el menor número de ratas posibles para los grupos control y experimentales que permitiera cumplir con los análisis estadísticos necesarios para el estudio.

Finalmente, las condiciones fueron adecuadas para estos animales en cuanto al área disponible, la limpieza, la ventilación y los ciclos de luz y oscuridad. Dichas condiciones fueron provistas por el personal del bioterio de IMSS siglo XXI.

8. RESULTADOS

8.1 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA POR WESTERN BLOT

La determinación de la dosis efectiva se realizó por medio de la técnica de Western blot 24 horas después de la inducción de estado epiléptico y la administración de FBS a diferentes dosis (10, 20, 30, 40 y 50 mg/kg) (Figura 3.AyB). Adicionalmente, se realizó el análisis estadístico correspondiente (Figura 3.C).

Se encontró que la dosis efectiva 50 corresponde a la dosis de 50mg/kg, debido a que dicha dosis fue la que mostró una disminución significativa ($p < 0.05$) comparada con AK en la expresión de COX2 y con que el resto de las dosis evaluadas.

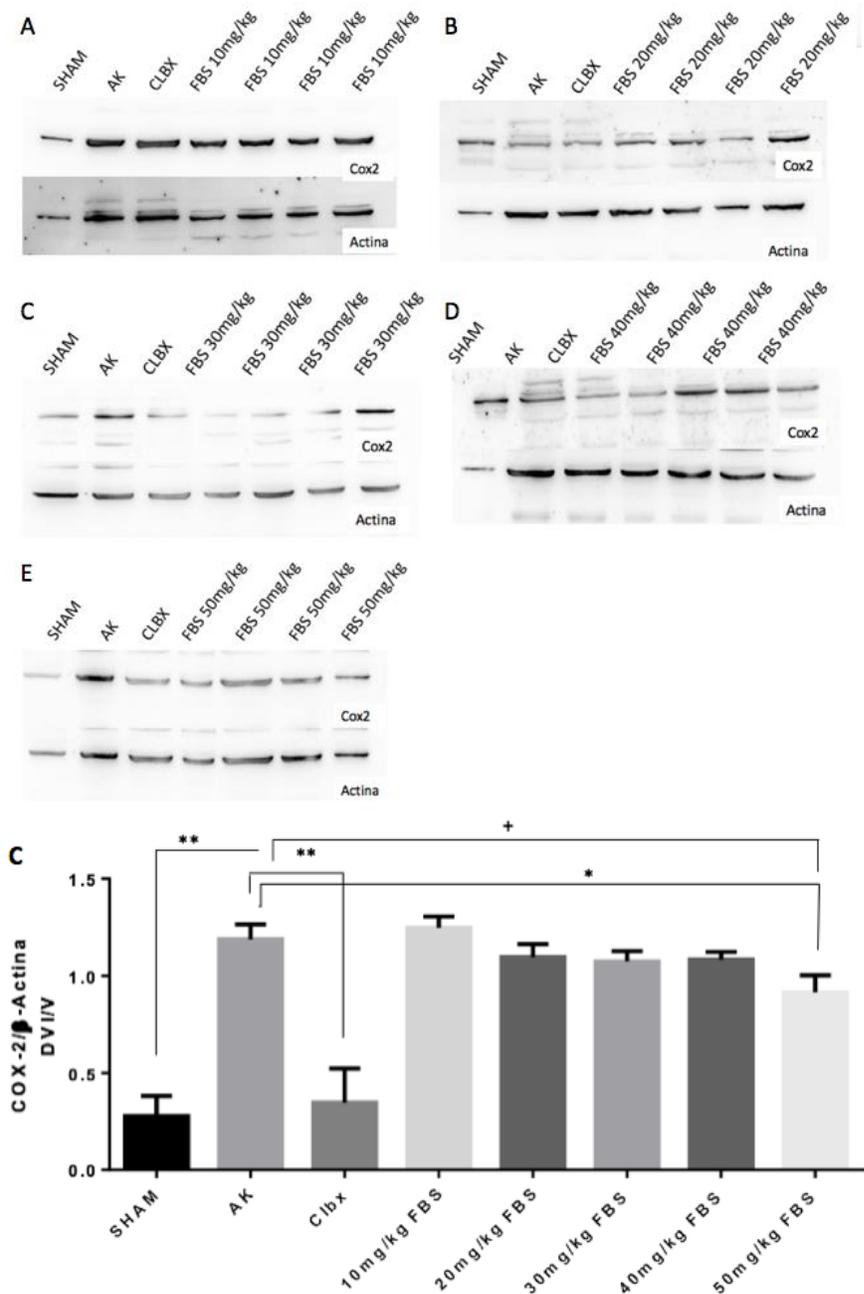


Figura 3. Análisis de la expresión de COX2. Se analizaron las 5 distintas dosis de FBS por medio de Western Blot para encontrar la dosis efectiva, es decir la que más redujera la proteína proinflamatoria COX2. De las cuatro dosis probadas, la dosis correspondiente a 50mg/kg resultó ser la dosis efectiva de FBS contra la expresión de COX2 en hipocampo (E). Anova de una vía con un poshoc de comparaciones múltiples de Dunnet's (* $p < 0.05$) y (** $p < 0.01$).

8.2 INMUNOFLUORESCENCIA

Dado que las áreas CA1, CA3 y Giro dentado son las más afectadas del hipocampo por la actividad convulsiva del ácido kaínico, se determinó la expresión de Cox-2 en estas áreas.

En el área CA1, la expresión de Cox-2 aumentó significativamente en el grupo AK en comparación con el SHAM ($p < 0.01$). El grupo AK-CLBX, mostró una disminución significativa en la expresión de Cox-2 en comparación con AK ($p < 0.05$). Del mismo modo, el grupo con el fármaco prueba AK+FBS también presentó una disminución significativa de Cox-2 en comparación con AK ($p < 0.05$). En ambos casos, la reducción de Cox-2 fue aproximadamente del 40% en comparación con el grupo AK. Lo que indica que el grupo AK+FBS se comporta de manera similar que el grupo AK+CLB. Adicionalmente, se observó que Cox-2 en CA1 se expresa principalmente en neuronas. Fue posible notar que la mayoría del tejido en grupo AK presenta la expresión de Cox-2 (**Figura 4**).

En el área CA3, al igual que en CA1, en el grupo SHAM se observó una baja expresión de Cox-2 en comparación con el AK ($p < 0.01$). En esta área del hipocampo, no se observó una disminución significativa entre la expresión de Cox-2 en el grupo AK y el grupo AK-CLB: sin embargo, sí existe una disminución significativa entre el grupo AK y el grupo prueba AK-FBS ($p < 0.05$). En comparación con el grupo AK, el grupo prueba AK+FBS presentó una reducción

del 40% en la expresión de Cox-2 aproximadamente. En el área CA3 parece ser que el fármaco prueba FBS mostró una mayor reducción en la expresión de Cox-2 que el celecoxib. Finalmente, la expresión de Cox-2 en CA1 se observó principalmente en los vasos y no en las neuronas **(Figura 5)**.

Por último, en el Giro Dentado nuevamente se observa que la expresión de Cox-2 es baja en el grupo control SHAM y aumenta significativamente en el grupo AK ($p < 0.01$). El grupo AK-CLBX, muestra una disminución significativa en la expresión en comparación con AK ($p < 0.05$). Sin embargo, es importante notar que en esta área no existe una reducción significativa en la expresión de Cox-2 en el grupo del fármaco prueba AK+FBS cuando se compara con AK. La disminución de Cox-2 es alrededor del 20%. Al igual que en CA3, la expresión de Cox-2 en GD se observa en neuronas y en los vasos **(Figura 6)**.

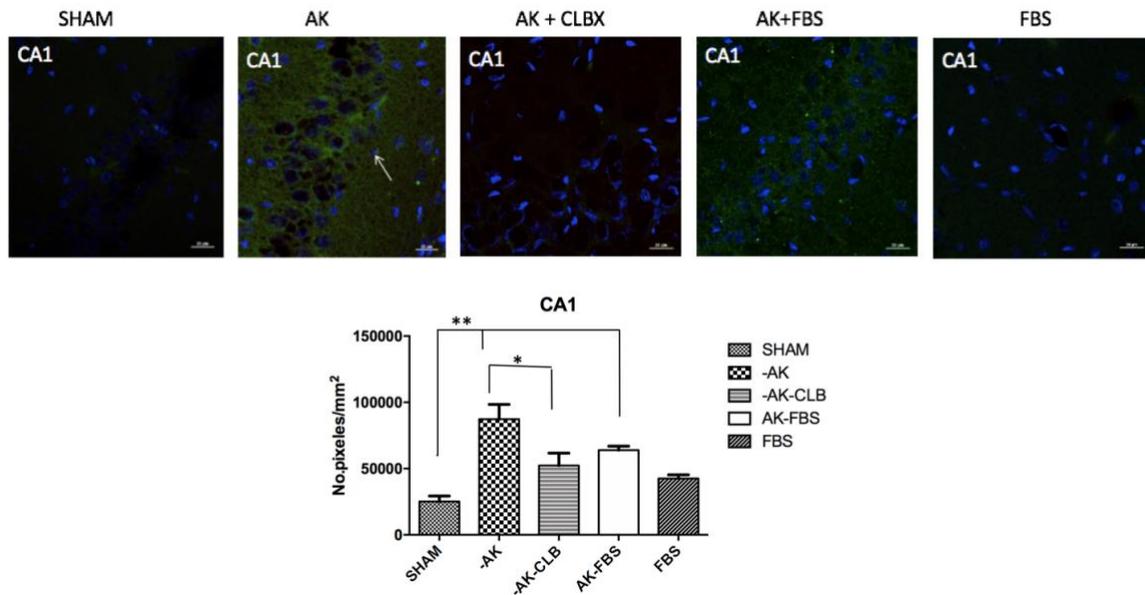


Figura 4. **Expresión de Cox-2 en zona CA1 del hipocampo.** La expresión de Cox-2 es baja en el grupo control SHAM y aumenta significativamente en el grupo AK. El grupo AK-Clbx, demuestra una disminución significativa en la expresión de Cox-2 en comparación con AK. El grupo con el fármaco prueba AK+FBS también presenta una disminución significativa de Cox-2 en comparación con AK y ninguna con el grupo AK+CLB. La expresión de Cox-2 en CA1 se observa principalmente en neuronas. ANOVA de una vía y poshoc Tukey's test (* $p < 0.05$) y (** $p < 0.01$). Cox-2 marcaje en verde y núcleos en azul.

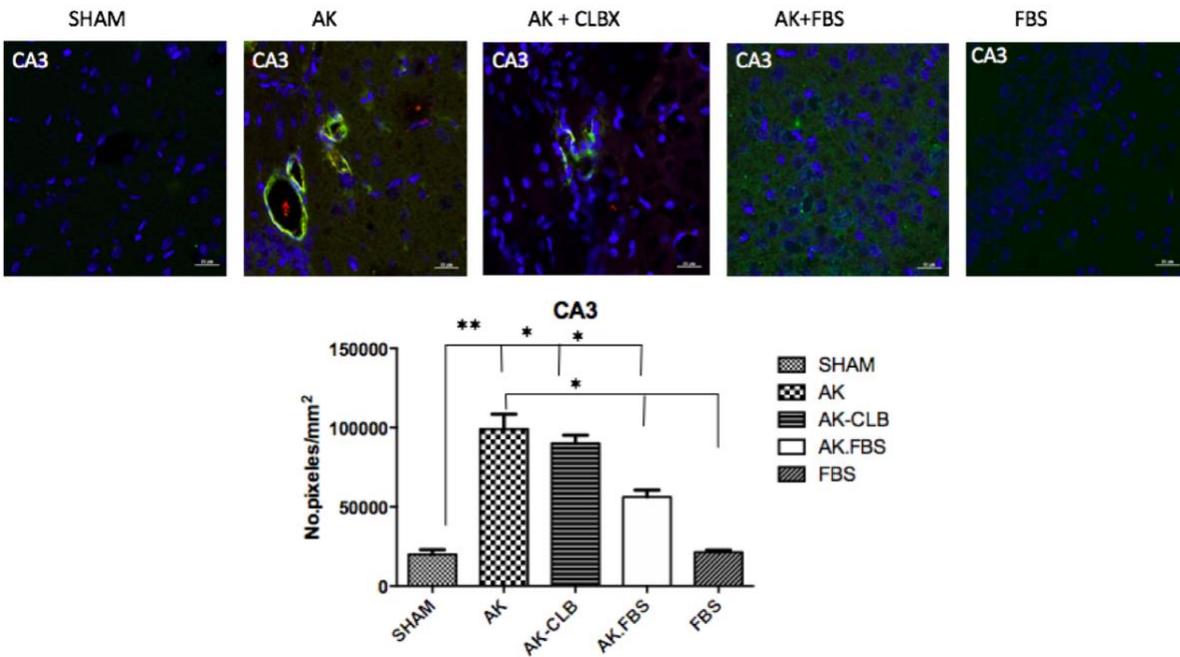


Figura 5. **Expresión de Cox-2 en zona CA3 del hipocampo.** La expresión de Cox-2 es baja en el grupo control SHAM y aumenta significativamente en el grupo AK. En CA3 no se observa una disminución significativa entre la expresión de Cox-2 en el grupo AK y el grupo AK-CLB; sin embargo, sí existe una disminución significativa entre el grupo AK y el grupo con el fármaco prueba AK-FBS. La expresión de Cox-2 en CA1 se observa principalmente en los vasos y no en las neuronas. ANOVA de una vía y poshoc Tukey's test (* $p < 0.05$) y (** $p < 0.01$). Cox-2 marcaje en verde y núcleos en azul.

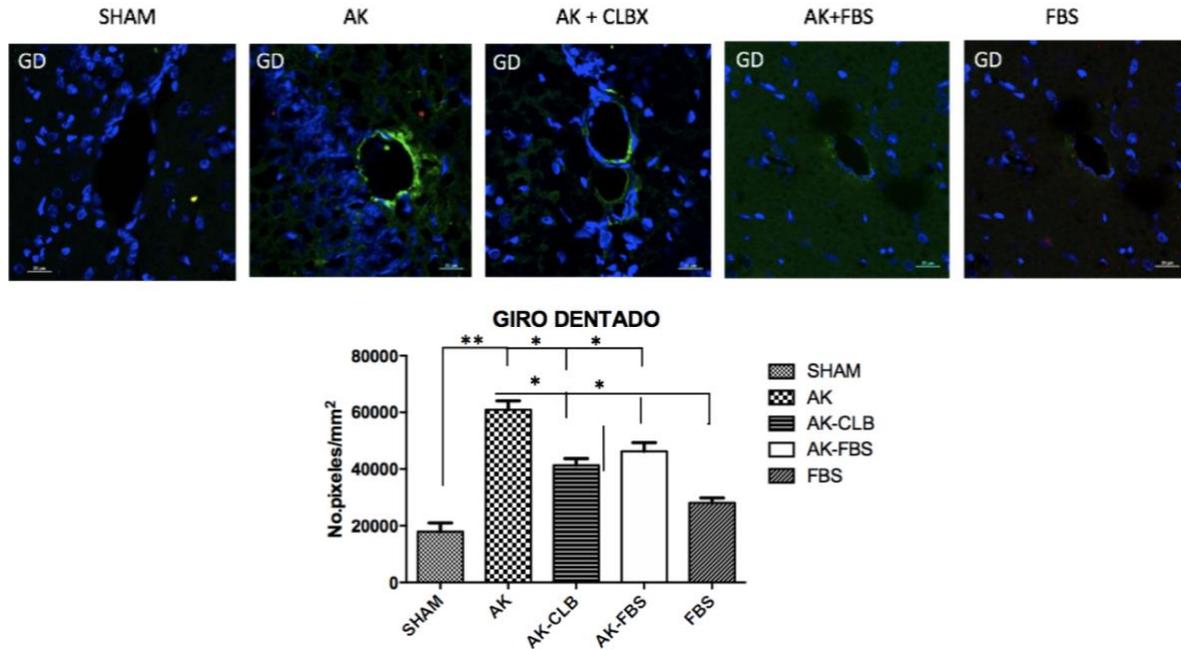


Figura 6. **Expresión de Cox-2 en zona Giro dentado del hipocampo.** La expresión de Cox-2 es baja en el grupo control SHAM y aumenta significativamente en el grupo AK. El grupo AK-Clbx, demuestra disminución significativa en la expresión en comparación con AK. El grupo AK+FBS no muestra una disminución significativa de Cox-2 al compararlo con AK y el grupo con el fármaco prueba AK-FBS, similar al mostrado en AK-CLBX. La expresión de Cox-2 en GD se observa en neuronas y en los vasos. ANOVA de una vía y poshoc Tukey's test (* $p < 0.05$) y (** $p < 0.01$). Cox-2 marcaje en verde y núcleos en azul.

8.3 EVALUACIÓN DE DAÑO NEURONAL POR FLUOROJADE

Para observar si el fármaco control genera algún daño neuronal en el hipocampo, se realizó una tinción de fluorojade B, que permite observar las neuronas en degeneración. De acuerdo a las imágenes observadas en un microscopio de epifluorescencia, se encontró que el número de neuronas en degeneración por milímetro cuadrado varía en los distintos grupos.

En el área CA1 del hipocampo, el grupo AK fue el que presentó mayor número de neuronas en degeneración en comparación con el grupo SHAM ($p < 0.05$), el cual mostró muy baja señal de FJ. El grupo AK+CLBX y el grupo AK+FBS mostraron menor número de neuronas en degeneración que el grupo AK. Sin embargo, aunque el grupo AK+CLBX presentó menor daño neurológico que el grupo prueba AK+FBS, es importante notar que sí hubo disminución en el daño neuronal en el grupo AK+FBS al ser comparado con el grupo AK (**Figura 7**).

En el área CA3 del hipocampo el grupo AK+FBS y el grupo AK+CLBX mostraron una reducción significativa ($p < 0.05$) en el número de neuronas en degeneración en comparación con el grupo AK. Al igual que en CA1, AK+CLBX presenta menor daño neurológico que el grupo prueba AK+FBS. Sin embargo, nuevamente se observa que AK+FBS presenta menor daño neuronal que AK (**Figura 8**).

Finalmente, y al igual que los casos anteriores, en el Giro dentado del hipocampo AK+FBS muestra menor número de neuronas en degeneración que el grupo AK

($p < 0.05$). Sin embargo, AK+CLBX presenta menor daño neurológico ($p < 0.01$) que el grupo prueba AK+FBS.

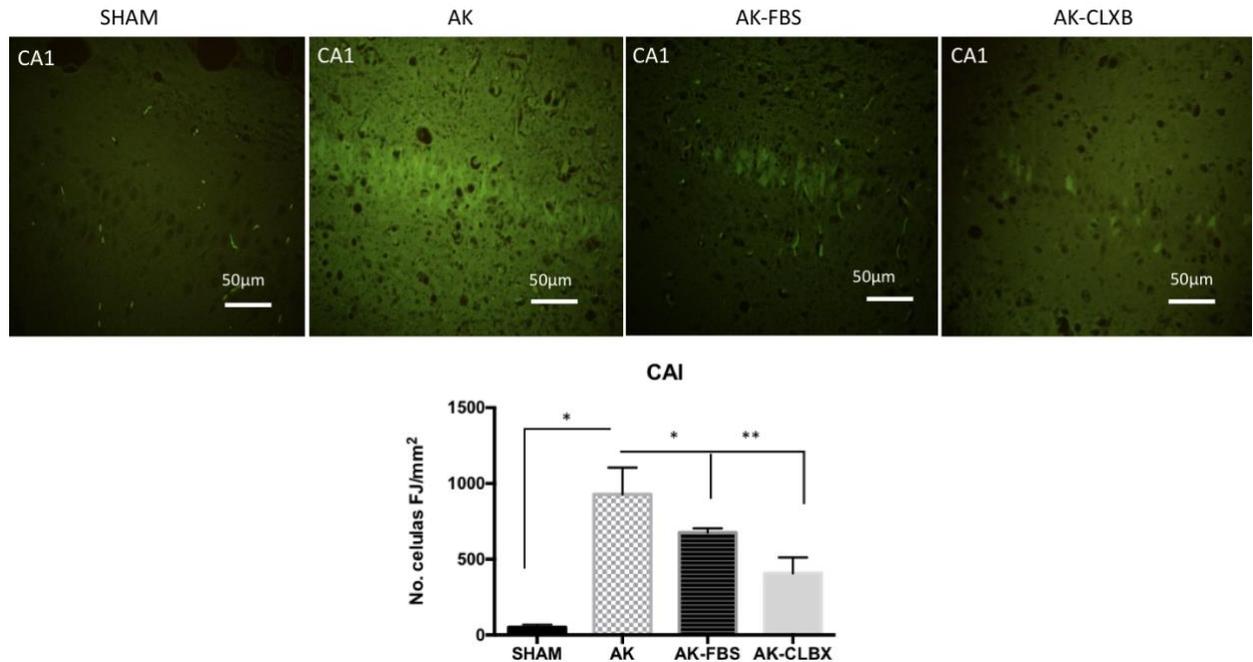


Figura 7. **Daño neuronal en zona CA1 de hipocampo.** El grupo AK+CLBX y el grupo AK+FBS mostraron menor número de neuronas en degeneración que el grupo AK. Aunque AK+CLBX presenta menor daño que el grupo prueba AK+FB, sí existe una disminución en el daño neuronal en el grupo AK+FBS al ser comparado con el grupo AK. ANOVA de una vía y poshoc Tukey's test (* $p < 0.05$) y (** $p < 0.01$).

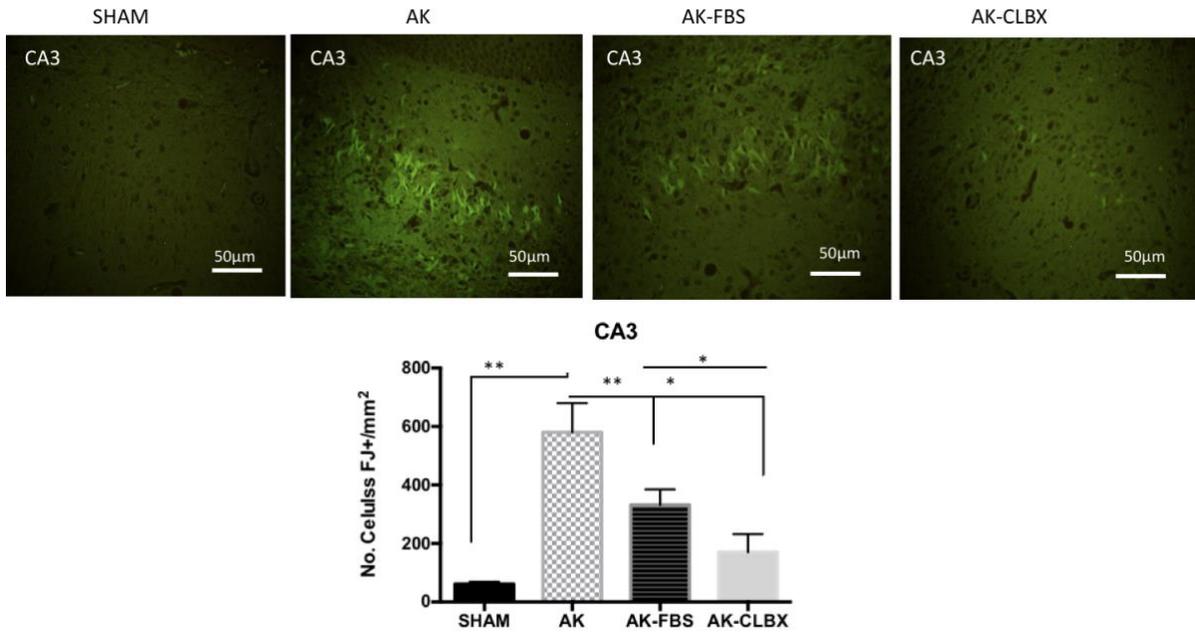


Figura 8. **Daño neuronal en zona CA3 de hipocampo.** El grupo AK+FBS y grupo AK+CLBX muestran una reducción significativa en el número de neuronas en degeneración en comparación con el grupo AK. ANOVA de una vía y poshoc Tukey's test (* $p < 0.05$) y (** $p < 0.01$).

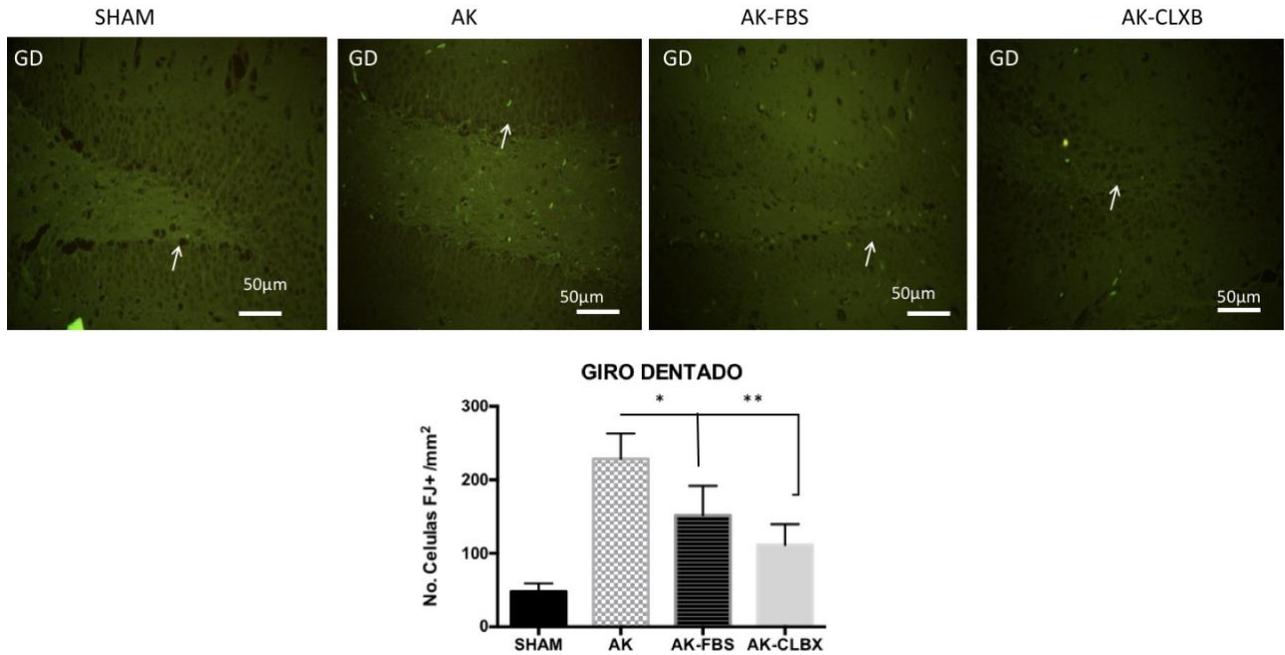


Figura 9. **Daño neuronal en zona CA3 de hipocampo.** El grupo AK+FBS y grupo AK+CLBX muestran una reducción significativa en el número de neuronas en degeneración en comparación con el grupo AK. ANOVA de una vía y poshoc Tukey's test (* $p < 0.05$) y (** $p < 0.01$).

9. DISCUSIÓN

Los estudios experimentales han demostrado que el daño asociado a las crisis convulsivas es mayor en el cerebro inmaduro que en el cerebro adulto (Jensen, 2000). Lo cual relaciona las crisis como un factor de riesgo para el desarrollo cerebral funcional en etapas tempranas y el establecimiento de enfermedades crónicas neurodegenerativas como la epilepsia. Durante el daño asociado a las crisis convulsivas y la epileptogénesis, las moléculas proinflamatorias juegan un papel muy importante, por lo que son consideradas blancos viables para el desarrollo neurológico correcto y una manera de evitar enfermedades crónicas (Holmes, 2002). Como se mencionó anteriormente, la Cox-2, es una enzima importante en el proceso inflamatorio y fármacos inhibidores selectivos como Celecoxib han mostrado que ofrecen protección en el cerebro adulto posterior al daño ocasionado por crisis convulsivas (Flower, 2003; Strauss, 2008). Sin embargo, dado que Celecoxib no puede ser administrado en el cerebro inmaduro debido a los efectos secundarios que ocasiona en el desarrollo del sistema cardiovascular (Funk et al., 2007), nosotros demostramos que el fármaco Fenil Butirato de Sodio puede actuar como un inhibidor de Cox-2 en el cerebro inmaduro, empleando un modelo de ratas inmaduras (12 PN) de la cepa Sprague Dawley.

En este trabajo se usó un modelo experimental de daño neurológico asociado a crisis convulsivas ocasionado por AK en ratas neonatas y se probó la eficacia del fármaco FBS como un inhibidor de la Cox-2. Entre las diferentes dosis probadas,

se determinó que la dosis 50mg/kg fue la que mayormente disminuyó la expresión de Cox-2 en hipocampo, según los análisis por Western Blot. Sugiriendo así que el fármaco FBS es capaz de reducir la expresión de esta ciclooxigenasa 2.

Posteriormente se procedió a estudiar por ensayos de inmunofluorescencia la localización de la expresión de Cox-2 en el hipocampo dorsal y comprobar si efectivamente el tratamiento con FBS disminuye dicha expresión. Se optó por estudiar la expresión de Cox-2 y el daño neuronal en el hipocampo dado a que se ha reportado previamente que las crisis convulsivas dañan esta región, particularmente induciendo muerte celular de neuronas piramidales e interneuronas en zonas CA1 y CA3, así como células granulares y generación de gliosis en Giro Dentado, (Domínguez et al., 2006; Sagar & Oxbury, 1987) Adicionalmente, también se sabe que la activación exacerbada de los receptores de Glutamato durante la excesiva actividad neuronal ocasionada por un *status epilepticus*, conducen a la muerte neuronal irreversible por la generación de especies reactivas de oxígeno y otras moléculas causadas durante la excitotoxicidad (Meldrum, 1993).

Los estudios realizados demostraron que el fármaco FBS reduce la expresión de Cox-2 tanto en CA3 como en GD, pero no en CA1, lo cual puede atribuirse a la zona y a la susceptibilidad de esta zona al daño neuronal (Song et al., 2018).

Posteriormente, los resultados de fluorojade mostraron que, en las tres zonas, los grupos AK+FBS presentaron menor número de neuronas en degeneración. Lo que

indica que el FBS no sólo reduce la expresión de Cox-2 posterior a una crisis convulsiva, sino que también ofrece un efecto protector posterior al daño por la crisis, resultando en la atenuación o la erradicación de una respuesta patológica a causa del daño asociado a la neuroinflamación (Figura 10).

Estos resultados indicaron que el FBS es un fármaco capaz de reducir la expresión de la molécula proinflamatoria Cox-2 y ofrecer un efecto neuroprotector posterior a una crisis convulsiva en el cerebro en desarrollo del modelo murino. Los resultados obtenidos fueron importantes pues nos permitieron proponer al FBS como un fármaco candidato viable para usar posterior a una crisis convulsi

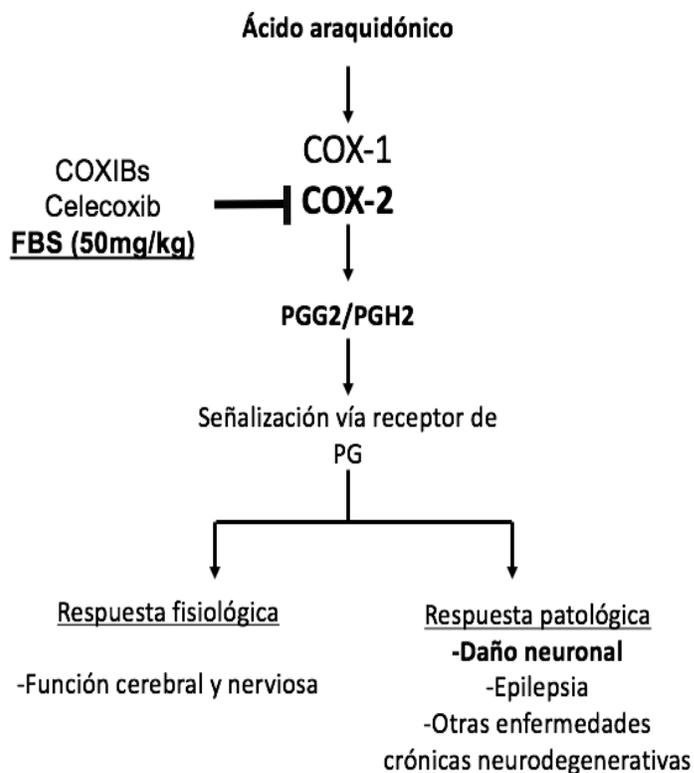


Figura 10. Resumen esquemático del posible mecanismo de acción de FBS (50mg/kg) como inhibidor de Cox-2 en ratas neonatas con daño neuronal asociado a crisis convulsivas por AK, es posible inhibir la cascada río abajo de la señalización. Se reduce el daño neuronal y con ello la probabilidad de desarrollar neuropatologías crónicas.

10. CONCLUSIONES

- La dosis efectiva de FBS (50mg/kg) fué capaz de reducir la expresión de Cox-2 en el hipocampo, posterior a la inducción de crisis convulsivas por AK en un modelo de ratas de la cepa Sprague Dawley. Efectos parecidos al celecoxib.
- Cox-2 en zona CA1 de hipocampo dorsal se expresa principalmente en neuronas; en CA3 dorsal se observa principalmente en los vasos y no en las neuronas; finalmente, en Giro dentado dorsal Cox-2 se observa tanto en las neuronas como en los vasos posterior a la actividad convulsiva.
- En las tres áreas escogidas de hipocampo dorsal, se observó un efecto neuroprotector conferido por el FBS posterior al daño neuronal asociado a crisis convulsivas inducidas por AK en ratas neonatas de la cepa Sprague Dawley.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Andreassi, C., Angelozzi, C., Tiziano, F. D., Vitali, T., De Vincenzi, E., Boninsegna, A., ... Brahe, C. (2004). Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: Relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *European Journal of Human Genetics*, *12*(1), 59–65.
<https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201102>
2. Barker-Haliski, M., & Steve White, H. (2015). Glutamatergic mechanisms associated with seizures and epilepsy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *5*(8), 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022863>
3. Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., & Gaiarsa, J.-L. L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *The Journal of Physiology*, *416*, 303–25. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1989.sp017762>
4. Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.-L., Tyzio, R., & Khazipov, R. (2007). GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. *Physiological Reviews*, *87*(4), 1215–1284.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2006>
5. Ben-Ari, Y., Lagowska, Y., Le Gal La Salle, G., Tremblay, E., Ottersen, O. P., & Naquet, R. (1978). Diazepam pretreatment reduces distant hippocampal damage induced by intra-amygdaloid injections of kainic acid. *European Journal of Pharmacology*, *52*(3–4), 419–420. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(78\)90302-3](https://doi.org/10.1016/0014-2999(78)90302-3)
6. Blaesse, P., Airaksinen, M. S., Rivera, C., & Kaila, K. (2009). Cation-Chloride Cotransporters and Neuronal Function. *Neuron*.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.03.003>

7. Bloss, E. B., & Hunter, R. G. (2010). Hippocampal kainate receptors. *Vitamins and Hormones*. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(10\)82009-6](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(10)82009-6)
8. Brusilow, S. W., Danney, M., Waber, L. J., Batshaw, M., Burton, B., Levitsky, L., ... Ward, J. (1984). Treatment of episodic hyperammonemia in children with inborn errors of urea synthesis. *The New England Journal of Medicine*, *310*(25), 1630–4. <https://doi.org/10.1056/NEJM198406213102503>
9. Chang, B. S., & Lowenstein, D. H. (2003). Mechanisms of disease Epilepsy. *New England Journal of Medicine*, *349*, 1257–66. <https://doi.org/10.1007/BF00116021>
10. Chen, Y., & Li, S. (2017). *Epilepsy, status epilepticus, and refractory status epilepticus. Refractory Status Epilepticus: Diagnosis and Treatment*. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5125-8_1
11. Choi, J., & Koh, S. (2008). Role of brain inflammation in epileptogenesis. *Yonsei Medical Journal*. <https://doi.org/10.3349/ymj.2008.49.1.1>
12. Dey, A., Kang, X., Qiu, J., Du, Y., & Jiang, J. (2016). Anti-Inflammatory Small Molecules to Treat Seizures and Epilepsy: From Bench to Bedside. *Trends in Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.03.001>
13. Domínguez, M. I., Blasco-Ibáñez, J. M., Crespo, C., Nacher, J., Marqués-Marí, A. I., & Martínez-Guijarro, F. J. (2006). Neural overexcitation and implication of NMDA and AMPA receptors in a mouse model of temporal lobe epilepsy implying zinc chelation. *Epilepsia*. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00501.x>
14. Flower, R. J. (2003). The development of COX2 inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd1034>

15. Funk, C. D., & FitzGerald, G. A. (2007). COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318157f72d>
16. Ghasemi, M., & Schachter, S. C. (2011). The NMDA receptor complex as a therapeutic target in epilepsy: A review. *Epilepsy and Behavior*.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2011.07.024>
17. Goldberg, E. M., & Coulter, D. A. (2013). Mechanisms of epileptogenesis: A convergence on neural circuit dysfunction. *Nature Reviews Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1038/nrn3482>
18. Gorter, J. A., Van Vliet, E. A., & Aronica, E. (2015). Status epilepticus, blood-brain barrier disruption, inflammation, and epileptogenesis. *Epilepsy and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.04.047>
19. Hauser, W. A., Annegers, J. F., & Kurland, L. T. (1993). Incidence of Epilepsy and Unprovoked Seizures in Rochester, Minnesota: 1935–1984. *Epilepsia*, 34(3), 453–458. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1993.tb02586.x>
20. Haut, S. R., Velíšková, J., & Moshé, S. L. (2004). Susceptibility of immature and adult brains to seizure effects. *Lancet Neurology*.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00881-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00881-6)
21. Hirst, W. D., Young, K. A., Newton, R., Allport, V. C., Marriott, D. R., & Wilkin, G. P. (1999). Expression of COX-2 by normal and reactive astrocytes in the adult rat central nervous system. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 13(1), 57–68. <https://doi.org/10.1006/mcne.1998.0731>
22. Holmes, G. L., Khazipov, R., & Ben-Ari, Y. (2002). New concepts in neonatal seizures. *Neuroreport*, 13(1), A3–A8. <https://doi.org/10.1097/00001756->

200201210-00002

23. Hyde, T. M., Lipska, B. K., Ali, T., Mathew, S. V., Law, A. J., Metitiri, O. E., ... Kleinman, J. E. (2011). Expression of GABA Signaling Molecules KCC2, NKCC1, and GAD1 in Cortical Development and Schizophrenia. *Journal of Neuroscience*, 31(30), 11088–11095.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1234-11.2011>
24. 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), 253–257. [https://doi.org/10.1002/1098-2779\(2000\)6:4<253::AID-MRDD4>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1098-2779(2000)6:4<253::AID-MRDD4>3.0.CO;2-P)
25. J.Ramos Lizana, L., Carrasco Marina, M., Vázquez López, M. ., Calvo Bonachera, E., & García Cassinello, E. (1996). Epidemiología de la epilepsia en la edad pediátrica: tipos de crisis epilépticas y síndromes epilépticos. *ANALES ESPAÑÓLES DE PEDIATRIA*, 45, 256–260.
26. Kang, H.-L., Benzer, S., & Min, K.-T. (2002). Life extension in *Drosophila* by feeding a drug. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(2), 838–843. <https://doi.org/10.1073/pnas.022631999>
27. Kaufmann, W. E., Worley, P. F., Pegg, J., Bremer, M., & Isakson, P. (1996). COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(6), 2317–2321. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.6.2317>
28. Kim, D. K., & Jang, T. J. (2006). Cyclooxygenase-2 expression and effect of celecoxib in flurothyl-induced neonatal seizure. *International Journal of*

- Experimental Pathology*, 87(1), 73–78. <https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2006.00457.x>
29. KOSAKA, T., MIYATA, A., IHARA, H., HARA, S., SUGIMOTO, T., TAKEDA, O., ... TANABE, T. (1994). Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *European Journal of Biochemistry*, 221(3), 889–897. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18804.x>
30. Kraemer, S., Meade, E., & DeWitt, D. (1992). Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site *Arch Biochem Biophys*. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1536575&dopt=Citation%5Cnpapers2://publication/uuid/C0888496-EADC-40BA-85F9-BDBA0136CB80
31. Iannitti, T., & Palmieri, B. (2012). Clinical and experimental applications of sodium phenylbutyrate. *Drugs in R&D*, 11(3), 227-49.
32. Lévesque, M., & Avoli, M. (2013). The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.10.011>
33. Maestri, N. E., Brusilow, S. W., Clissold, D. B., & Bassett, S. S. (1996). *Long-term treatment of girls with ornithine transcarbamylase deficiency. The New England journal of medicine* (Vol. 335). <https://doi.org/10.1056/NEJM199609193351204>
34. Marchi, N., Angelov, L., Masaryk, T., Fazio, V., Granata, T., Hernandez, N., ... Janigro, D. (2007). Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption.

- Epilepsia*, 48(4), 732–742. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.00988.x>
35. Meldrum, B. S. (1993). Excitotoxicity and Selective Neuronal Loss in Epilepsy. In *Brain Pathology*. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1993.tb00768.x>
36. Neligan, A., & Shorvon, S. D. (2010). Frequency and prognosis of convulsive status epilepticus of different causes: A systematic review. *Archives of Neurology*. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.169>
37. Otto, J., & Smith, W. (1995). Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and-2. *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling*, 12, 136–156. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=13239524288540145403related:-3aXxTE9vLcJ
38. Owens, D. F., & Kriegstein, A. R. (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn919>
39. Pisani, F., Cerminara, C., Fusco, C., & Sisti, L. (2007). Neonatal status epilepticus vs recurrent neonatal seizures: Clinical findings and outcome. *Neurology*, 69(23), 2177–2185. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000295674.34193.9e>
40. Pressler, R. (2012). Neonatal seizures. *Introduction to Epilepsy*, 565–579. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139103992.022>
41. Raol, Y. S. H., Lapidus, 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), 326–336. <https://doi.org/10.1002/ana.21593>
42. Rojas, A., Jiang, J., Ganesh, T., Yang, M. S., Lelutiu, N., Gueorguieva, P., &

- Dingledine, R. (2014). Cyclooxygenase-2 in epilepsy. *Epilepsia*.
<https://doi.org/10.1111/epi.12461>
43. Roy, A., Ghosh, A., Jana, A., Liu, X., Brahmachari, S., Gendelman, H. E., & Pahan, K. (2012). Sodium phenylbutyrate controls neuroinflammatory and antioxidant activities and protects dopaminergic neurons in mouse models of Parkinson's disease. *PLoS ONE*, 7(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038113>
44. Sagar, H. J., & Oxbury, J. M. (1987). Hippocampal neuron loss in temporal lobe epilepsy: Correlation with early childhood convulsions. *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.410220309>
45. Schmuck, G., & Kahl, R. (2009). The use of Fluoro-Jade in primary neuronal cell cultures. *Archives of Toxicology*, 83(4), 397–403.
<https://doi.org/10.1007/s00204-008-0360-4>
46. Song, Q., Fan, C., Wang, P., Li, Y., Yang, M., & Yu, S. Y. (2018). Hippocampal CA1 β caMKII mediates neuroinflammatory responses via COX-2/PGE2 signaling pathways in depression. *Journal of Neuroinflammation*.
<https://doi.org/10.1186/s12974-018-1377-0>
47. Strauss, K. I. (2008). Antiinflammatory and neuroprotective actions of COX2 inhibitors in the injured brain. *Brain, Behavior, and Immunity*.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.09.011>
48. Turini, M. E., & Dubois, R. N. (2002). CYCLOOXYGENASE - 2 : A Therapeutic Target. *Annu . Rev . Med*, 53, 35–57.
<https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.103952>
49. Velíšek, L., Kubová, H., Velíšková, J., Mareš, P., & Ortová, M. (1992). Action of

Antiepileptic Drugs Against Kainic Acid-Induced Seizures and Automatism
During Ontogenesis in Rats. *Epilepsia*, 33(6), 987–993.

<https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1992.tb01748.x>

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

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.04.004>

51. Vezzani, A., & Granata, T. (2005). Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence, Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence. *Epilepsia*, *Epilepsia*, 46, 46(11, 11), 1724, 1724–1743, 1743. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00298.x>

52. Yamagata, K., Andreasson, K. I., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., & Worley, P. F. (1993). Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: Regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*, 11(2), 371–386.

[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90192-T](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90192-T)

53. Zhou, C., Sun, H., Klein, P. M., & Jensen, F. E. (2015). Neonatal seizures alter NMDA glutamate receptor GluN2A and 3A subunit expression and function in hippocampal CA1 neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9.

<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00362>