



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PLAN DE ESTUDIOS COMBINADOS EN MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MANUEL VELASCO SUÁREZ
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS SEDE SUR

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE FÁRMACOS ANTICONVULSIVANTES EN COMBINACIÓN
CON NEUROMODULACIÓN EN CRISIS CONVULSIVAS FARMACORRESISTENTES

TESIS
QUE OPTA POR EL GRADO DE
DOCTOR EN MEDICINA

PRESENTA:
DANIEL PÉREZ PÉREZ

DIRECTORES DE TESIS:
DRA. LUISA LILIA ROCHA ARRIETA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS SEDE SUR

DR. JULIO EVERARDO SOTELO MORALES
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MANUEL VELASCO SUÁREZ

COMITÉ TUTOR:
DRA. ANA LUISA VELASCO MONROY
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO EDUARDO LICEAGA

DR. JOAQUÍN MANJARREZ MARMOLEJO
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MANUEL VELASCO SUÁREZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MAYO 2021



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.

Todos los procedimientos experimentales presentados en la tesis fueron realizados en el Laboratorio 8 del Departamento de Farmacobiología de la Sede Sur del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

DEDICATORIA

A mis padres por darme todo lo necesario para llegar hasta donde estoy

A mis padrinos Gabi y Carlos por siempre estar presentes y apoyando cuando fue necesario

A mi hermano por todos los crecimientos que hemos vivido juntos y las horas de diversión que hemos compartido

A toda mi familia, mis cuatro abuelos, mis tías y tíos y todos mis primos por siempre echarme porras y apoyarme en mi sueño

A mis tutores y comité tutor porque sin su apoyo nada de este trabajo hubiera sido posible

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rocha por todas sus enseñanzas académicas y personales y porque, aunque somos partos prolongados, nunca se cansa de pujar hasta que lo logramos.

Al Dr. Sotelo por ser una inspiración como investigador médico y por sus comentarios de abogado del diablo que siempre te invitan a reflexionar sobre tus resultados.

A la Dra. Velasco porque además de ser parte de mi comité tutor, mi primer acercamiento a la investigación fue a su lado. Al Dr. Manjarrez por su disponibilidad para poder discutir mis resultados y sus acertados comentarios sobre el rumbo que llevaba mi tesis.

Un agradecimiento especial al Dr. Walter Besio de la Universidad de Rhode Island por la confianza en permitirnos estudiar su tecnología y su apoyo, tanto personal como académico. A la Dra. Sandra Orozco Suárez y a la Dra. Iris Feria Romero del Instituto Mexicano del Seguro Social por su dedicación y apoyo al enseñarme nuevas técnicas y para la discusión de los resultados.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado a través de la beca de doctorado nacional 622940.

A Christopher, Daniel F, Dr. José Luis “Cabrera”, Ángeles, Cindy, Francia, Eduardo, Alma, Ada, Ana, Christian, Dianita y a todos mis amigos en CINVESTAV por todos esos momentos de sana diversión y crecimiento académico que compartimos.

A las Dra. Lupita, Dra. Espe (Q.E.P.D.), Dra. Paty, Dra. Chelita, Dra. Rox, y Dr. Benjamín por todas las enseñanzas y su apoyo durante mi fase inicial en la investigación. Nunca olvidaré su dedicación y entrega al realizar este trabajo.

A Abril, Diana, Carlos, Krystal, Iannel, Saraí y Carol por todos los momentos que hemos pasado y todos los aprendizajes que hemos compartido.

Finalmente, a mi familia por siempre estar ahí.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | I |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | II |
| ABREVIATURAS..... | III |
| RESUMEN..... | IV |
| ABSTRACT..... | VI |
| 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1. Epilepsia..... | 1 |
| 1.2. Epilepsia Resistente a Fármacos..... | 2 |
| 1.3. Mecanismos de Resistencia en ERF..... | 2 |
| 1.3.1. Glicoproteína P..... | 5 |
| 1.4. Tratamiento actual de la ERF..... | 5 |
| 1.5. Estimulación Focal Transcraneal..... | 9 |
| 1.5.1. Efecto anticonvulsivo, antiepileptogénico y neuroprotector de la TFS..... | 9 |
| 2. Metodología General..... | 12 |
| 2.1. Animales, ética y habituación..... | 12 |
| 2.2. Evaluación conductual..... | 12 |
| 2.3. Estimulación Focal Transcraneal..... | 13 |
| 3. Experimento 1. Efecto de la TFS (1 mA) sobre una crisis convulsiva aguda generalizada..... | 14 |
| 3.1. Metodología Experimental..... | 14 |
| 3.1.1. Grupos experimentales..... | 14 |
| 3.1.2. Análisis estadístico..... | 15 |
| 3.2. Resultados..... | 15 |
| 3.3. Discusión..... | 15 |
| 4. Experimento 2. Efecto de la TFS a 1 mA en combinación con FAC en la expresión de una crisis convulsiva aguda generalizada..... | 17 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.1. | Metodología experimental..... | 17 |
| 4.1.1. | Grupos experimentales..... | 17 |
| 4.1.2. | Análisis estadístico | 18 |
| 4.2. | Resultados | 18 |
| 4.3. | Discusión..... | 20 |
| 5. | Experimento 3. Efecto de la TFS a 50 mA sobre una crisis convulsiva aguda generalizada | 23 |
| 5.1. | Metodología experimental..... | 23 |
| 5.1.1. | Grupos experimentales..... | 23 |
| 5.1.2. | Análisis estadístico | 23 |
| 5.2. | Resultados | 23 |
| 5.3. | Discusión..... | 24 |
| 6. | Experimento 4. Efecto de la TFS a 50 mA sola y en combinación con FAC sobre crisis convulsivas en animales con hiperexcitabilidad cerebral. | 26 |
| 6.1. | Metodología experimental..... | 26 |
| 6.1.1. | Inducción de crisis convulsivas repetitivas | 26 |
| 6.1.2. | Ensayo cruzado..... | 27 |
| 6.1.3. | Análisis estadístico y tamaño de la muestra | 28 |
| 6.2. | Resultados | 28 |
| 6.3. | Discusión..... | 30 |
| 7. | Experimento 5. Efecto de la TFS a 50 mA sobre la expresión de la Pgp inducida por una crisis convulsiva aguda generalizada | 34 |
| 7.1. | Metodología experimental..... | 35 |
| 7.1.1. | Grupos experimentales..... | 35 |
| 7.1.2. | Western Blot..... | 36 |
| 7.1.3. | Análisis estadístico | 37 |
| 7.2. | Resultados | 38 |
| 7.3. | Discusión..... | 39 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 8. Perspectivas y limitaciones..... | 41 |
| 8.1. Perspectivas..... | 41 |
| 8.2. Limitaciones..... | 42 |
| 9. Referencias | 43 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Características de estimulación de la Estimulación Focal Transcraneal. Se muestra un diagrama con la dosis de estimulación utilizada (A), un dibujo representativo de la conformación del TCRE (B) y un esquema con la posición aproximada del electrodo en la cabeza de la rata (C)..... | 13 |
| Figura 2. Diagrama del protocolo experimental (A), parámetros de la Estimulación Focal Transcraneal (TFS, B) y línea temporal de las intervenciones experimentales (C) utilizados en los experimentos 1 y 2. | 18 |
| Figura 3. Prevalencia (paneles superiores) y latencia (paneles inferiores) a crisis convulsivas menores y mayores en los diferentes grupos experimentales..... | 19 |
| Figura 4. Máxima Intensidad Convulsiva media en los diferentes grupos experimentales. | 20 |
| Figura 5. Modelo computacional del campo eléctrico inducido por la Estimulación Focal Transcraneal a 50 mA..... | 22 |
| Figura 6. Diagrama del esquema experimental utilizado para evaluar los diferentes tratamientos en los animales con crisis convulsivas repetitivas. | 27 |
| Figura 7. Prevalencia (paneles superiores) y latencia (paneles inferiores) de las crisis convulsivas menores y mayores en ratas con crisis convulsivas repetitivas bajo los distintos tratamientos: | 29 |
| Figura 8. Representación de la máxima intensidad convulsiva alcanza por las ratas con crisis convulsivas farmacorresistentes bajo los diferentes tratamientos evaluados | 30 |
| Figura 9. Diagrama del protocolo experimental utilizado para evaluar la expresión de la glicoproteína P (Pgp) después de una crisis convulsiva aguda inducida por ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) y los efectos de la estimulación focal transcraneal (TFS)..... | 36 |
| Figura 10. Representación de la expresión de la glicoproteína-P (Pgp) en la corteza cerebral y el hipocampo de los animales bajos las diferentes condiciones experimentales: vehículo (SS) o Estimulación Focal Transcraneal (TFS) o después de una crisis convulsiva inducida por Ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) solo o asociado con TFS (TFS-MPA). | 38 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Definición conceptual y práctica de la epilepsia de acuerdo con la ILAE..... | 1 |
| Tabla 2. Intensidad y severidad de las crisis convulsivas inducidas por ácido 3-mercaptopropiónico | 12 |
| Tabla 3. Severidad e intensidad de las crisis convulsivas inducidas por Ácido 3-mercaptopropiónico y la TFS a 1 mA | 15 |
| Tabla 4. Severidad e intensidad de las crisis convulsivas inducidas por Ácido 3-mercaptopropiónico y la TFS a 50 mA | 23 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------|---|
| ILAE | <i>International League Against Epilepsy</i> |
| DALY | <i>Disability-Adjusted Life-Years</i> |
| EUA | Estados Unidos de América |
| ERF | Epilepsia Resistente a Fármacos |
| FAC | Fármacos Anticonvulsivantes |
| PHT | Fenitoína |
| GABA | Ácido gama-aminobutírico |
| Pgp | Glicoproteína P |
| TMS | <i>Transcranial Magnetic Stimulation</i> |
| DBS | <i>Deep Brain Stimulation</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| COFEPRIS | Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios |
| VNS | <i>Vagal Nerve Stimulation</i> |
| RNS | <i>Reactive Neurostimulation</i> |
| tDCS | <i>Transcranial Direct Current Stimulation</i> |
| TFS | <i>Transcranial Focal Stimulation</i> |
| TCRE | <i>Tripolar Concentric Ring Electrodes</i> |
| CINVESTAV | Centro de Investigación y Estudios Avanzados |
| SS | Solución Salina |
| i.p. | Intraperitoneal |
| MPA | Ácido 3-mercaptopropiónico |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| TBS-T | SS amortiguada con Tris-Tween |

RESUMEN

La neuromodulación es una alternativa terapéutica para pacientes con Epilepsia Resistente a Fármacos (ERF). La Estimulación Focal Transcraneal (TFS) a 50 mA es una estrategia de neuromodulación no invasiva con efectos anticonvulsivantes, neuroprotectores y antiepileptogénicos en modelos experimentales. A través de varios experimentos, se exploraron los efectos de la TFS a diferentes intensidades en un modelo de crisis convulsivas generalizadas inducidas por ácido 3-mercaptopropiónico (MPA). Además, se exploró el efecto de la TFS en crisis convulsivas generalizadas y sobre la expresión de glicoproteína P (Pgp).

Inicialmente, se evaluó el efecto de la TFS a 1 mA sola o en combinación con fenitoína. Debido a que la intensidad de 50 mA es mayor a la que utilizan otras estrategias de neuromodulación. Se registró la prevalencia y latencia a crisis menores y mayores. La administración de TFS a 1 mA no modificó las características de las crisis convulsivas generalizadas inducidas por MPA ($p > 0.05$). Por otro lado, la combinación de TFS a 1 mA con fenitoína indujo una menor latencia a crisis menores ($p < 0.05$) en comparación con el grupo que recibió fenitoína sola. Posteriormente, se decidió incrementar la intensidad de la TFS a 50 mA. Al igual que con 1 mA, la TFS a 50 mA no modificó las características de las crisis convulsivas inducidas por MPA ($p > 0.05$).

Como siguiente experimento, se decidió evaluar el efecto de la TFS a 50 mA sola y en combinación con fenitoína en un modelo de hiperexcitabilidad cerebral inducida por la inducción repetitiva de crisis convulsivas generalizadas. Debido a que estudios previos reportan que los efectos de neuromodulación dependen del estado de excitabilidad cerebral. Las terapias administradas independientemente no modificaron las características de las crisis convulsivas en estos animales ($p > 0.05$). Sin embargo, la combinación de TFS con fenitoína indujo una menor prevalencia (50%, $p < 0.05$ vs MPA y fenitoína) y un aumento en la latencia ($p < 0.05$ vs MPA) de las crisis mayores.

El efecto de TFS con fenitoína es similar al observado con la combinación de fármacos inhibidores de la Pgp con fármacos anticonvulsivos en este modelo. Además, la aplicación de estimulación por corriente alterna reduce la expresión y función de Pgp *in vitro*. Por lo anterior, se decidió evaluar el efecto de la TFS sobre la expresión de Pgp desde la primera crisis convulsiva. Por medio de Western Blot, se identificó una sobreexpresión de la Pgp a nivel cortical ($68 \pm 13.4\%$, $p < 0.05$) e hipocampal ($48.5 \pm 14\%$, $p < 0.05$) posterior

a una crisis convulsiva inducida por MPA. Por otro lado, la aplicación de TFS en animales intactos generó un aumento en la expresión cortical de Pgp ($67 \pm 31.1\%$, $p < 0.05$). Sin embargo, la aplicación de TFS como pretratamiento previno la sobreexpresión de Pgp inducida por la crisis convulsiva. La TFS es una estrategia de neuromodulación con el potencial de modificar la expresión y función de la Pgp. Además, su combinación con fenitoína es capaz de reducir la severidad de las crisis convulsivas en un modelo de crisis convulsivas farmacorresistentes e hiperexcitabilidad cerebral.

ABSTRACT

Neuromodulation is a therapeutic alternative for patients with drug-resistant epilepsy (DRE). Transcranial Focal Stimulation (TFS) at 50 mA is a non-invasive neuromodulation strategy with anticonvulsant, neuroprotective, and antiepileptogenic effects in experimental models. Through several experiments, the effects of TFS at different intensities were explored in a 3-mercaptopropionic acid (MPA)-induced generalized seizure model. Also, the effect of TFS on generalized seizures and P-glycoprotein (Pgp) expression was explored.

Initially, the effect of TFS at 1 mA alone or in combination with phenytoin was evaluated. Because the intensity of 50 mA is higher than that using other neuromodulation strategies. Prevalence and latency to minor and major seizures were recorded. Administration of TFS at 1 mA did not modify the characteristics of MPA-induced generalized seizures ($p>0.05$). On the other hand, the combination of TFS with phenytoin induced a shorter latency to minor seizures ($p<0.05$) compared to the group receiving phenytoin alone. Subsequently, it was decided to increase the TFS intensity to 50 mA. As with 1 mA, TFS at 50 mA did not modify the characteristics of MPA-induced seizures ($p>0.05$).

As a next experiment, it was decided to evaluate the effect of TFS at 50 mA alone and in combination with phenytoin in a model of brain hyperexcitability induced by the repetitive induction of generalized seizures. Because previous studies report that neuromodulation effects depend on the state of brain excitability. Therapies administered independently did not modify seizure characteristics in these animals ($p>0.05$). However, the combination of TFS with phenytoin induced a lower prevalence (50%, $p<0.05$ vs MPA and phenytoin) and increased latency ($p<0.05$ vs MPA) of major seizures.

The effect of TFS with phenytoin is like that observed with the combination of Pgp inhibitor drugs with antiseizure drugs in this model. Also, the application of alternating current stimulation inhibits and reduces Pgp expression *in vitro*. Therefore, it was decided to evaluate the effect of TFS on Pgp expression from the first seizure. Western blotting identified an overexpression of Pgp at cortical ($68 \pm 13.4\%$, $p>0.05$) and hippocampal ($48.5 \pm 14\%$, $p>0.04$) levels after an MPA-induced seizure. On the other hand, TFS application in intact animals generated an increase in cortical Pgp expression ($67 \pm 31.1\%$, $p<0.05$). However, application of TFS as pretreatment prevented seizure induced Pgp overexpression. TFS is a neuromodulation strategy with the potential to modify Pgp

expression and function. Moreover, its combination with phenytoin can reduce seizure severity in a model of pharmacoresistant seizures and cerebral hyperexcitability.

1. Introducción

1.1. Epilepsia

La epilepsia es una enfermedad del cerebro que se caracteriza por una actividad neuronal excesiva y sincrónica que provoca signos o síntomas transitorios (Tabla 1, Fisher et al., 2005). En la práctica clínica, el diagnóstico de epilepsia se realiza ante la presencia de una crisis convulsiva más un alto riesgo de presentar una segunda, la presencia de dos crisis epilépticas separadas por 24 horas o por el diagnóstico de un síndrome epiléptico (Tabla 1, Fisher et al., 2014). Esta enfermedad tiene una prevalencia de 0.6% en el mundo, lo que la convierte en una de las enfermedades neurológicas más frecuentes (Fiest et al., 2017). La prevalencia de epilepsia en México es mayor, de hasta 2.5% (Chong et al., 2013; San-Juan et al., 2015).

Tabla 1. Definición conceptual y práctica de la epilepsia de acuerdo con la ILAE

| | |
|-----------------------|--|
| Definición conceptual | La epilepsia es un trastorno cerebral que se caracteriza por una predisposición continuada a la aparición de crisis epilépticas y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de esta enfermedad. La definición de epilepsia requiere la presencia de al menos una crisis epiléptica. |
| Definición práctica | La epilepsia es una enfermedad cerebral que se define por cualquiera de las siguientes circunstancias: 1. Al menos dos crisis no provocadas (o reflejas) con >24 h de separación 2. Una crisis no provocada (o refleja) y una probabilidad de presentar nuevas crisis durante los 10 años siguientes similar al riesgo general de recurrencia (al menos el 60 %) tras la aparición de dos crisis no provocadas 3. Diagnóstico de un síndrome de epilepsia |

ILAE, International League Against Epilepsy

La epilepsia provoca una pérdida de 13.5 millones de DALY (Disability-Adjusted Life-Years) para los pacientes (Beghi et al., 2019). Está pérdida en la calidad de vida de los pacientes se asocia a un costo aproximado de 10 a 50 mil dólares para el sistema de salud de Estados Unidos de América (EUA) (Begley & Durgin, 2015). Se desconoce este costo en México.

1.2. Epilepsia Resistente a Fármacos

Pese al tratamiento farmacológico de las crisis convulsivas, aproximadamente 30% de los pacientes presentan Epilepsia Resistente a Fármacos (ERF) (Kalilani et al., 2018). Esta se define como la falta de respuesta terapéutica a dos esquemas con fármacos anticonvulsivos (FAC) adecuadamente tolerados e indicados (Kwan et al., 2010). La presencia de farmacorresistencia incrementa el impacto en la calidad de vida de los pacientes con epilepsia en especial a los que presentan convulsiones tónico-clónicas (Sheikh et al., 2020). Además, los pacientes con ERF tienen más síntomas psiquiátricos y son más estigmatizados que los pacientes sin farmacorresistencia (Deleo et al., 2020; Janson & Bainbridge, 2021). Se ha calculado que la ERF tiene un costo de hasta 2600 dólares por paciente para el sistema de salud mexicano (García-Contreras et al., 2006).

No hay estudios que determinen la prevalencia de la ERF en México. Sin embargo, podría ser una gran cantidad si consideramos la tercera parte de los pacientes con epilepsia (Chong et al., 2013; San-Juan et al., 2015). No hay un mecanismo que explique esta resistencia farmacológica (Pérez-Pérez et al., 2019; Tang et al., 2017). Sin embargo, existen varias hipótesis que han sido estudiadas para tratar de explicar este fenómeno.

1.3. Mecanismos de Resistencia en ERF

El conocimiento de los mecanismos básicos que subyacen a la ERF es importante para el desarrollo de mejores y más seguras terapias (Löscher & Schmidt, 2011). Para la resistencia en epilepsia no se ha descrito un mecanismo lineal al que poder modular y revertir el fenotipo farmacorresistente (Tang et al., 2017). Incluso, es probable que la farmacorresistencia en epilepsia sea consecuencia de la alteración en múltiples factores biológicos que pueden ir desde la información genómica hasta la conectividad funcional del cerebro (Pérez-Pérez et al., 2019). Asimismo, se distinguen 4 diferentes tipos de farmacorresistencia clínicamente: 1) de novo, 2) retrasado, 3) fluctuante, y 4) inicialmente resistente y posteriormente sensible (Schmidt & Löscher, 2005). En los siguientes párrafos se explicarán brevemente 6 hipótesis que tratan de explicar la resistencia farmacológica en epilepsia.

La **Hipótesis de la Red Neural** indica que la resistencia a FAC es consecuencia de la formación de conexiones neuronales aberrantes e hiperexcitables (Fang et al., 2011). En apoyo a esta hipótesis se ha descrito que el 65% de los pacientes con ERF están libres de crisis (40% bajo terapia farmacológica y 25% sin FAC) después de la resección quirúrgica

del foco epiléptico (Wiebe & Jette, 2012). Además, se han descrito múltiples cambios en la conformación neural de los cerebros de pacientes con epilepsia, entre estos destacan la formación aberrante de conexiones hipocampales, la activación de astrocitos y la reorganización sináptica (Fang et al., 2011). Sin embargo, la hipótesis no explica el porcentaje de pacientes que continúan con farmacorresistencia pese a la cirugía (35%), tampoco explica la presencia de cambios en la red neural en pacientes sin farmacorresistencia (Fang et al., 2011).

La **Hipótesis del Blanco Terapéutico** propone que los blancos terapéuticos sufren modificaciones estructurales que los hacen menos afines a los FAC (Remy & Beck, 2006). Esta hipótesis se basa en que la carbamacepina no inhibe el canal de sodio en pacientes con ERF o en animales con epilepsia del lóbulo temporal (Remy et al., 2003). Este fenómeno también se observó en el tratamiento con la fenitoína (PHT) (Remy et al., 2003). El receptor a ácido gama-aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés) también presenta este tipo de modificaciones (Loup et al., 2000). Está hipótesis no explica la presencia de resistencia a fármacos con más de un mecanismo de acción o a múltiples fármacos con diferente mecanismo de acción en un mismo paciente (Bjørke et al., 2018; Chen et al., 2018; Stephen et al., 2012).

Por otro lado, la **Hipótesis de la Severidad Intrínseca** atribuye la resistencia farmacológica en epilepsia a una manifestación de la severidad de la enfermedad (Rogawski, 2013). Esta hipótesis se basa en que el principal factor de riesgo conocido para ERF es una alta frecuencia y/o severidad de crisis convulsivas previo al consumo del primer FAC (Hitiris et al., 2007; Sillanpää & Schmidt, 2009). Al igual que en humanos, una alta frecuencia de crisis antes del primer tratamiento es un indicador asociado a resistencia a fármacos en animales (Löscher & Brandt, 2010a). En nuestro laboratorio se describió que los animales farmacorresistentes presentan una mayor liberación de glutamato y requieren menos estimulaciones para llegar al estado Kindling ([ver sección 1.5.1](#)) (Luna-Munguia et al., 2011). Esta hipótesis no explica los patrones de resistencia en los que los pacientes remiten espontáneamente o en los que fluctúan entre resistencia y control (Löscher et al., 2020).

La **Hipótesis de la Variabilidad Génica** sugiere que la farmacorresistencia se asocia a alteraciones en los genes que codifican para proteínas relacionadas con la fisiopatología de la epilepsia o el metabolismo de los FAC (Löscher & Schmidt, 2011). Existen polimorfismos que se asocian con una mayor necesidad de FAC para el adecuado control

de los pacientes con epilepsia (Tate et al., 2005; Van der Weide et al., 2001). También hay polimorfismos que se asocian a la farmacorresistencia en pacientes con ERF (Abe et al., 2008; Kwan et al., 2008). Sin embargo, la mayoría de los estudios que investigan estas asociaciones genéticas en epilepsia tiene limitaciones metodológicas (Löscher et al., 2020). Además de esta hipótesis, la epigenómica estudia las moléculas capaces de modificar dinámicamente la expresión de los genes. Estas moléculas también se han visto asociadas a la farmacorresistencia en ERF (Brennan & Henshall, 2018; Liu et al., 2016). Por esta situación, se ha propuesto ampliar la hipótesis a una **Hipótesis Genómica** (Pérez-Pérez et al., 2019) que incluya tanto las alteraciones de la información genética como las modificaciones epigenéticas.

La **Hipótesis Farmacocinética** dice que los pacientes con ERF presentan una mayor expresión de proteínas metabolizadoras y de eliminación de FAC en el hígado o riñón y como consecuencia una menor concentración plasmática de estos fármacos (F. Tang et al., 2017). Esta hipótesis deriva de la observación de bajos niveles plasmáticos de FAC pese al ajuste en su dosificación y administración en pacientes con ERF (Czornyj et al., 2018; Lancelin et al., 2007; Lazarowski et al., 2004). Por otro lado, existe una mayor expresión de transportadores o enzimas metabolizadoras de FAC a nivel periférico (Yue et al., 2018) o en la barrera hematoencefálica en pacientes con ERF (Ghosh et al., 2011). Sin embargo, no todos los pacientes con ERF presentan alteración en los niveles plasmáticos de los FAC (Ishikawa et al., 2019; Sheinberg et al., 2015) y en modelos experimentales de farmacorresistencia no se ha observado este fenómeno (Brandt et al., 2006; Löscher & Brandt, 2010a).

Por último, la **Hipótesis del Transportador de Fármacos** indica que una expresión incrementada de proteínas transportadoras de fármacos provoca una menor concentración cerebral de los FAC y, con esto, la incapacidad de controlar las crisis epilépticas (Brandt et al., 2006; Lazarowski et al., 2007). Este grupo de proteínas está formado por la proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos (Lazarowski et al., 1999; Sun et al., 2016), la proteína asociada a resistencia en cáncer de mama (Sisodiya & Thom, 2003) y la glicoproteína-P (Pgp, por sus siglas en inglés) (Hartz et al., 2017; Tishler et al., 1995). El presente trabajo utiliza fundamentalmente esta hipótesis particularmente la Pgp debido a que esta hipótesis es la más estudiada por el potencial de utilizar estas proteínas como blancos terapéuticos.

1.3.1. Glicoproteína P

Este transportador es una glicoproteína de 170 kDa dependiente de adenosina trifosfato (Löscher & Potschka, 2005; Yakusheva & Titov, 2018). La Pgp se expresa normalmente en barreras de flujo como la barrera hematoencefálica, la barrera hematotesticular, la placenta, los riñones y los intestinos. En condiciones normales, las células del parénquima cerebral (neuronas, neuroglia y astrocitos) no expresan esta proteína (Uhlen et al., 2015) aunque se han detectado bajos niveles de expresión de su gen en el hipocampo (Kwan et al., 2003). La Pgp elimina residuos metabólicos tóxicos y xenobióticos del cuerpo y del cerebro. Sin embargo, su estructura molecular le permite movilizar también fármacos (Silva et al., 2015; Yakusheva & Titov, 2018). Entre los fármacos transportados por la Pgp se encuentran algunos FAC como la PHT, el fenobarbital, levetiracetam, lamotrigina, entre otros (Luna-Tortós et al., 2008; Zhang et al., 2012).

En pacientes con ERF, la Pgp se sobreexpresa en el endotelio vascular, astrocitos y neuronas (Marchi et al., 2004; Tishler et al., 1995). Esta alteración está presente independientemente de la etiología de la ERF incluyendo esclerosis hipocampal, tumores neuroepiteliales y displasia cortical (Sisodiya et al., 2002). Al igual que los pacientes, esta sobreexpresión aberrante está presente en tejido cerebral de animales con crisis convulsivas y epilepsia farmacorresistentes (Enrique et al., 2017; Guo & Jiang, 2010; Hartz et al., 2017; Potschka et al., 2004; Van Vliet et al., 2007; Volk & Löscher, 2005). Esta sobreexpresión de Pgp se asocia a una menor concentración parenquimatosa de algunos FAC tanto en pacientes (Rambeck et al., 2006) como en modelos experimentales de crisis convulsivas y epilepsia farmacorresistentes (Höcht et al., 2007, 2009; Ma et al., 2013; Van Vliet et al., 2007). Finalmente, la inhibición farmacológica de este transportador con nimodipino o tariquidar revierte el fenotipo farmacorresistente en animales (Höcht et al., 2007, 2009; Ma et al., 2013; Schlichtiger et al., 2010).

1.4. Tratamiento actual de la ERF

Las alternativas terapéuticas para los pacientes con ERF son cuatro principales: FAC experimentales, cirugía de epilepsia, dieta cetogénica y neuromodulación (Dalic & Cook, 2016). Algunas de estas alternativas no están disponibles para todos los pacientes por razones clínicas, sociales o económicas (Engel, 2018; San-Juan et al., 2015).

La cirugía de epilepsia consiste en eliminar el foco de inicio o las redes de propagación que provocan las crisis epilépticas en los pacientes (Sheng et al., 2017). Esta alternativa

terapéutica se asocia a una mayor proporción de pacientes libres de crisis cuando se compara con el manejo médico optimizado (Liu et al., 2018). Sin embargo, no todos los pacientes con ERF son candidatos a este tipo de procedimiento (Engel & Wiebe, 2012) y existe la probabilidad de desarrollar efectos adversos consecuencia de la cirugía (Brotis et al., 2019).

Por otro lado, la investigación en el reposicionamiento o el desarrollo de nuevos fármacos para la epilepsia ha llevado al descubrimiento de algunos que pueden ser útiles en la clínica (Löscher et al., 2020). Sin embargo, la adición de más fármacos a la terapia de los pacientes con ERF se acompaña de la aparición de más efectos adversos y posibles interacciones medicamentosas para los pacientes (Bjørke et al., 2018; De Oliveira Baldoni et al., 2018; Stephen et al., 2012).

La adición de una dieta alta en grasas y baja en carbohidratos (cetogénica o sus variaciones) tiene efectos anticonvulsivantes en los pacientes con ERF (Neal et al., 2008; Ye et al., 2015). Sin embargo, la falta de apego es un importante problema en este tipo de terapia (Ye et al., 2015). Por otro lado, los estudios aleatorizados y controlados sobre esta intervención están categorizados como de baja calidad según la base de datos de Cochrane (Martin-McGill et al., 2018). Además, este tipo de dieta se asocia a efectos adversos gastrointestinales hasta en el 25% de los pacientes (Martin-McGill et al., 2018; Neal et al., 2008).

Por último, la neuromodulación se define como “la alteración de la actividad nerviosa mediante la administración selectiva de un estímulo, como la estimulación eléctrica o los agentes químicos, en lugares neurológicos específicos del cuerpo” (Thomson, 2013). Estas técnicas pueden ir desde técnicas no invasivas como estimulación magnética transcraneal (TMS) hasta técnicas quirúrgicas como la estimulación cerebral profunda (DBS, por sus siglas en inglés) (Fisher & Velasco, 2014; Thomson, 2013). La FDA (*Food and Drug Administration*), el equivalente a la COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios) en EUA, ha aprobado 3 diferentes sistemas de neuromodulación para su aplicación en pacientes con ERF (Izadi et al., 2018). Estas técnicas de neuromodulación son invasivas y requieren de una intervención quirúrgica pero también existen técnicas no invasivas que están bajo investigación (Kwon et al., 2018).

Las técnicas invasivas de neuromodulación son la estimulación del nervio vago (VNS, por sus siglas en inglés), la Neuroestimulación Reactiva (RNS, por sus siglas en inglés) y

la DBS. Por otro lado, las técnicas no invasivas de neuromodulación son principalmente la Estimulación Eléctrica Transcraneal por Corriente Directa (tDCS, por sus siglas en inglés respectivamente) y la TMS.

La DBS consiste en implantar un electrodo de estimulación directamente en la región causante de las crisis epilépticas o de su propagación y un marcapaso que se encarga de dar el impulso eléctrico para la estimulación. La efectividad de la DBS depende del tipo de epilepsia y el blanco utilizado. La aplicación de DBS en el núcleo anterior del tálamo y en el hipocampo ha demostrado una reducción del 50% en la frecuencia de crisis en más del 70% de los pacientes (Li & Cook, 2018). Sin embargo, el único sitio aprobado por la FDA es el núcleo anterior del tálamo (Zangiabadi et al., 2019). En epilepsia del lóbulo temporal se ha descrito una reducción del 70% en la frecuencia de crisis hasta en el 59% de los pacientes (Chang & Xu, 2018). Los efectos adversos más comunes secundarios a DBS están relacionados con el dispositivo y su implantación (dolor en sitio quirúrgico, parestesias o sensación de choque eléctrico). Entre los efectos adversos más severos están la infección del sitio quirúrgico, depresión, suicidio y deterioro cognitivo (Salanova et al., 2015).

La VNS, al igual que la DBS, consiste en la implantación de un marcapaso, pero el electrodo de estimulación es colocado alrededor del nervio vago (González et al., 2019). El 49% de los pacientes presentan una reducción de más del 50% en la frecuencia de crisis convulsivas posterior a la implantación de la VNS, aunque esta efectividad depende del tipo de epilepsia y la edad de los pacientes (Englot et al., 2016; Pérez-Carbonell et al., 2020). Sin embargo, la VNS también presenta efectos adversos. Estos se categorizan como moderados incluyendo desde una ronquera transitoria hasta la infección del sitio quirúrgico (Ohemeng & Parham, 2020; Pakdaman et al., 2016).

Finalmente, la RNS es el único sistema de neuromodulación de asa cerrada, esto quiere decir que el sistema estimula cuando detecta actividad ictal electroencefalográfica. Este método de neuroestimulación consiste en la implantación de una red de electrodos de registro más uno o dos electrodos profundos de estimulación (Boon et al., 2018). La RNS indujo una reducción del 50% de las crisis convulsivas en el 64.6% en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, mientras que la tasa fue 55% en pacientes con crisis convulsivas originarias de corteza no temporal (Geller et al., 2017; Jobst et al., 2017; Skarpaas et al., 2019). Al igual que el resto de los métodos de neuroestimulación invasiva, la RNS se asocia a efectos adversos como la infección del sitio quirúrgico, depresión, hemorragia intracraneal y deterioro en la memoria (Geller et al., 2017). Pese a la efectividad

de las técnicas de neuromodulación invasiva, son necesarias tecnologías que reduzcan los efectos adversos o la necesidad de una intervención quirúrgica.

La tDCS consisten en la aplicación de corriente eléctrica (1-2 mA) a través de dos electrodos colocados en su cuero cabelludo (San-Juan et al., 2015). Existe una amplia variedad de estudios clínicos que muestran efectos benéficos de este tipo de neuroestimulación para el control de crisis epilépticas en pacientes con ERF (Kwon et al., 2018). Sin embargo, estos estudios no son suficientes para recomendarla en la clínica (Lefaucheur et al., 2017). Los principales efectos adversos reportados son comezón en el sitio de aplicación e irritación dérmica reversible (Gschwind & Seeck, 2016).

Por otro lado, la TMS utiliza un generador magnético que es localizado sobre la cabeza del paciente en la región a estimular (Kimiskidis, 2010). Existen varios estudios clínicos que muestran una reducción en la frecuencia de las crisis epilépticas en pacientes con ERF (Cooper et al., 2018). En un metaanálisis de Cochrane se describió una reducción en la frecuencia de las crisis convulsivas, pero la evidencia fue categorizada como baja (Chen et al., 2016). Por otro lado, un metaanálisis sobre la TMS aplicada repetitivamente demostró un efecto significativo de la intervención en comparación con el grupo control (Mishra et al., 2020). Por esto, no es posible determinar su utilidad clínica al momento y se continúa estudiando. Los principales efectos adversos declarados para este tipo de neuroestimulación son tinnitus, dolor de cabeza y mareos (Chen et al., 2016; Cooper et al., 2018; Mishra et al., 2020).

Pese a toda la información recabada de las técnicas de neuromodulación invasivas y no invasivas, los mejores blancos de estimulación para controlar las crisis epilépticas son desconocidos (Theodore & Fisher, 2004). Como se ha visto con la DBS, no todas las regiones cerebrales son blancos adecuados para el control de las crisis epilépticas (Zangiabadi et al., 2019). La tDCS y la TMS generan un campo eléctrico con baja resolución espacial que afecta amplias regiones cerebrales incluyendo varios blancos (Iwahashi et al., 2017; Vöröslakos et al., 2018). Esto puede estar asociado con la falta de efectos benéficos para los pacientes con ERF observados en ciertos estudios (Chen et al., 2016; Lefaucheur et al., 2017). Durante la presente tesis se utilizó la Estimulación Focal Transcraneal (TFS, por sus siglas en inglés) una tecnología diferente a las comentadas previamente (Bikson et al., 2019).

1.5. Estimulación Focal Transcraneal

La TFS es una técnica de neuromodulación no invasiva (Besio et al., 2007; Makeyev et al., 2012) que consiste en la aplicación de corriente eléctrica a través de Electrodoes Tripolares de Anillos Concéntricos (TCRE, por sus siglas en inglés) sobre el cuero cabelludo (Besio et al., 2010). Este tipo de neuromodulación tiene la ventaja de focalizar el campo eléctrico debajo del mismo electrodo y con esto una mejor resolución espacial y focalización de la estimulación (Datta et al., 2008; Wiley & Webster, 1982).

La TFS genera cambios en el campo eléctrico cortical e hipocampal dependiendo del montaje del electrodo (Besio et al., 2011; Makeyev et al., 2012). La alteración del campo eléctrico hipocampal puede tener efectos deletéreos sobre la memoria (Ólafsdóttir et al., 2018). Sin embargo, la aplicación aguda y crónica de TFS no genera este tipo de alteraciones (Luby et al., 2014; Rogel-Salazar et al., 2013) ni muerte neuronal hipocampal (Besio et al., 2013; Mucio-Ramírez & Makeyev, 2017).

Los principales efectos adversos de la neuromodulación eléctrica no invasiva son la irritación dérmica y comezón (Gschwind & Seeck, 2016). Esto es consecuencia a un calentamiento del electrodo que es proporcional a la intensidad de la estimulación (Datta et al., 2008; Khadka et al., 2018). La aplicación de TFS no genera alteraciones histológicas o quemaduras en la piel de la rata en donde se aplica (Besio et al., 2010). Estudios preliminares indican que en el humano tampoco genera sensación de quemadura o choque eléctrico (Pérez-Pérez et al., 2019). Al presente, el único efecto adverso inducido por la TFS es una reducción en la actividad locomotora en los primeros minutos después de su aplicación en las ratas (Luby et al., 2014; Rogel-Salazar et al., 2013).

La TFS tiene efectos anticonvulsivantes, antiepileptogénicos y neuroprotectores a nivel experimental. A continuación, se detallará la investigación que se ha realizado al respecto.

1.5.1. Efecto anticonvulsivo, antiepileptogénico y neuroprotector de la TFS

La TFS ha demostrado reducir la intensidad y severidad de las crisis convulsivas inducidas por diferentes métodos experimentales. La aplicación intracisternal de penicilina G genera crisis mioclónicas repetitivas en ratas (Besio et al., 2010; Patwardhan, 2005). Este efecto está asociado a un antagonismo al sitio de unión a benzodiazepinas del receptor A a GABA (Chen et al., 1986). La TFS (50 mA durante 2 minutos) redujo en 50% la frecuencia

de las mioclonías inducidas por penicilina. Además, la administración repetitiva de TFS eliminó completamente este tipo de crisis convulsivas en los animales (Besio et al., 2010).

El pentilinetetrazol es un antagonista del receptor a GABA y produce crisis convulsivas progresivamente más severas desde convulsiones mioclónicas hasta tónico-clónicas generalizadas (Velíšková et al., 2017). Al aplicar TFS (50 mA durante 2 minutos) inmediatamente después de la primera crisis mioclónica, se observó una reducción en la duración y presencia de este mismo tipo de crisis convulsivas en comparación con los animales no estimulados (Besio et al., 2013; Besio et al., 2010; Makeyev et al., 2013). Este efecto se ha asociado a una reducción en la sincronización cerebral de alta frecuencia causada por el pentilinetetrazol (Besio et al., 2011). También se observó que la TFS revierte el incremento en el poder espectral de frecuencias altas causado por la administración de pentilinetetrazol (Besio et al., 2013; Makeyev et al., 2011).

La pilocarpina es un proconvulsivante capaz de inducir estado epiléptico de crisis clónicas en roedores (Ahmed Juvale & Che Has, 2020). La aplicación de TFS (50-60 mA por 1 minuto) 5 minutos después del establecimiento del estado epiléptico es capaz de disminuir la actividad epileptiforme en el electroencefalograma, la severidad de las crisis convulsivas hasta desaparecerlas y aumentar la sobrevivencia de las ratas (Besio et al., 2007). Estos efectos de la TFS se aprecian hasta 2 horas después del término de su aplicación (Besio et al., 2010). Por otro lado, cuando la TFS (50 mA durante 2 minutos) se aplica antes de que se inicie el estado epiléptico inducido por pilocarpina no previene su aparición ni reduce su severidad a menos que se combine con diazepam (Besio et al., 2013).

La TFS previene la muerte neuronal hipocampal consecuencia del estado epiléptico de crisis clónicas inducido por pilocarpina. Este efecto es mayor cuando se combina con diazepam (Besio et al., 2013). Además, la aplicación de TFS (300 Hz, 100 μ A, 2 h y sobre el cráneo) evita la sobreliberación de GABA y glutamato que se induce en este mismo modelo (Santana-Gómez et al., 2015).

El *Kindling* es un fenómeno en el que la administración repetitiva de estímulos eléctricos o químicos inicialmente subumbrales causa cambios progresivos hasta que el animal presenta crisis epilépticas (Goddard, 1983). Este modelo simula la epilepsia del lóbulo temporal y presenta varios tipos de crisis convulsivas desde mioclonías hasta crisis focales con generalización tónico-clónica. Cuando el animal presenta la máxima intensidad de las crisis ante el estímulo subumbral se le conoce como estado *Kindling* (Sutula & Kotloski,

2017). Este modelo simula el proceso de epileptogénesis por lo que el evitar su desarrollo se considera un efecto antiepileptogénico (Löscher & Brandt, 2010b). La administración de TFS (300 Hz, 2 minutos y sobre el cráneo) inmediatamente después de cada estímulo *Kindling* en amígdala cerebral retrasa el proceso de epileptogénesis en gatos. Por otra parte, la TFS induce efectos duraderos. Una vez concluida la TFS, los animales presentaron un retraso de hasta 20 días más en el desarrollo de la epileptogénesis (Valdés-Cruz et al., 2019). Por el contrario, la TFS aplicada 40 minutos antes de cada estímulo tipo *Kindling* no induce efectos antiepileptogénicos.

Las evidencias anteriores indican que la TFS: a) reduce la frecuencia y duración de crisis convulsivas mioclónicas inducidas por pentilinetetrazol, b) previene la progresión a crisis convulsivas clónico-tónicas en el modelo de pentilinetetrazol y de crisis clónicas inducidas por pilocarpina y c) retrasa el proceso de epileptogénesis en el modelo de *Kindling* amigdalino incluso días después de que se dejó de aplicar. Además, la adición de diazepam aumenta los efectos de la TFS en el modelo de estado epiléptico inducido por pilocarpina. Durante la presente tesis decidimos se decidió evaluar a través de diferentes experimentos el efecto de diferentes intensidades de la TFS a diferentes intensidades en un modelo de crisis convulsivas agudas generalizadas. Además, también se exploró el efecto de la TFS sola y en combinación con FAC en un modelo de hiperexcitabilidad cerebral. Finalmente, se describe exploramos el efecto de la TFS sobre la expresión de Pgp en animales intactos y con crisis convulsivas.

2. Metodología General

2.1. Animales, ética y habituación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de entre 250 y 300 gramos al inicio de los experimentos. Los animales fueron alojados en el bioterio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) Sede Sur bajo condiciones controladas: ciclo luz-oscuridad de 12:12 horas, temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad relativa de 60 a 80%. El manejo de los animales se realizó de acuerdo con las reglamentaciones instauradas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos de Salud de EUA.

Todos los animales se sometieron a un proceso de habituación a la manipulación humana con la finalidad de reducir su estrés (Costa et al., 2012; Sandra et al., 1990). Esta habituación consistió en la administración de solución salina (SS, NaCl 0.9% p/v, 1 ml/kg, intraperitoneal [i.p.]) y la colocación de un TCRE en la piel de la cabeza del animal por 5 minutos, ambos procedimientos se realizaron cada 24 horas por 7 días.

2.2. Evaluación conductual

Se evaluaron los cambios conductuales de acuerdo con la escala modificada de Veliskova (Velísková et al., 1990): fase 0, sin cambios conductuales; fase 1, mioclonías aisladas; fase 2, Clonus atípico (asimétrico o unilateral); fase 3, clonus típico; fase 4, conducta de escape; y fase 5, crisis clónico-tónicas (Tabla 2). Se registró la presencia y la latencia a cada una de las fases, así como la fase máxima alcanzada después de cada administración. La severidad de las crisis se dividió en crisis menores (fases 1 a 3) y que se asocian a la activación del cerebro anterior, y crisis mayores (fases 4 y 5) que se asocian a la propagación de la actividad eléctrica cerebral al tallo cerebral (Velíšková & Velíšek, 2017).

Tabla 2. Intensidad y severidad de las crisis convulsivas inducidas por ácido 3-mercaptopropiónico

| <i>Valor de intensidad (Fases)</i> | <i>Severidad</i> | <i>Característica conductual</i> |
|--|-------------------|--|
| 0 | - | Sin cambios conductuales |
| 1 | Crisis menores | Mioclonías aisladas |
| 2 | | Clonus atípico (asimétrico o unilateral) |

| | | |
|---|---------|------------------------|
| 3 | | Clonus típico |
| 4 | Crisis | Conducta de escape |
| 5 | mayores | Crisis clónico-tónicas |

Modificado de Velísková et al. 1990.

2.3. Estimulación Focal Transcraneal

La TFS consistió en la aplicación de pulsos cuadrados bifásicos de carga y duración balanceada. La duración de cada pulso cuadrado fue de 200 μ s con un retraso entre el pulso positivo y negativo de 100 μ s. La frecuencia de la estimulación fue de 300 Hz (Fig. 1A). Los pulsos de estimulación se dieron a través del anillo externo y el disco de los TCRE, que son de cobre chapado en oro (Fig. 1B). Se utilizaron dos estimuladores Grass S48, uno generó el pulso positivo y el otro el negativo. Se rasuró la cabeza de la rata y se preparó la piel por 5 minutos con la aplicación de gel abrasivo NuPrep® previo a los experimentos. El TCRE se colocó sobre la piel de la cabeza de la rata, en la línea media entre el borde posterior de sus ojos y el borde anterior de sus orejas (Fig. 1C). Se utilizó pasta Ten20® como interfase entre el TCRE y la piel de la rata.

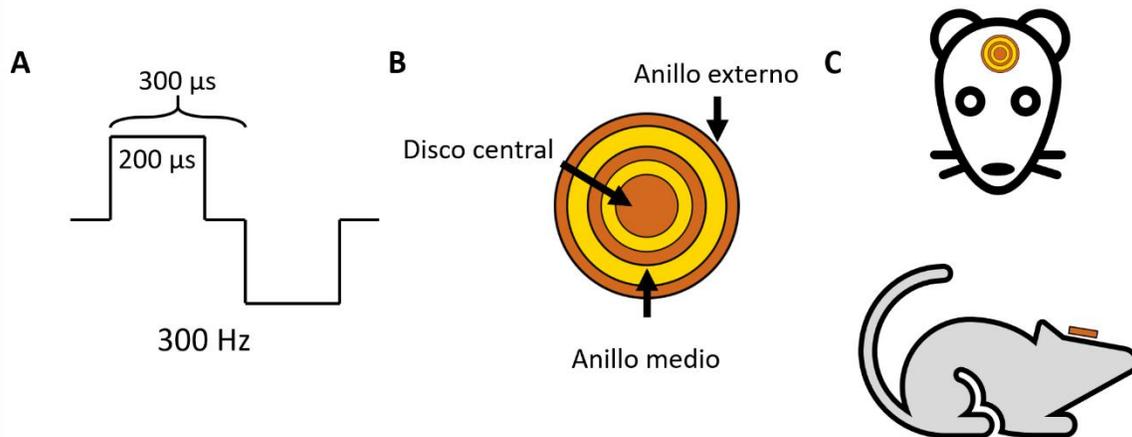


Figura 1. Características de estimulación de la Estimulación Focal Transcraneal. Se muestra un diagrama con la dosis de estimulación utilizada (A), un dibujo representativo de la conformación del TCRE (B) y un esquema con la posición aproximada del electrodo en la cabeza de la rata (C).

3. Experimento 1. Efecto de la TFS (1 mA) sobre una crisis convulsiva aguda generalizada

Las evidencias sobre el efecto anticonvulsivante de la TFS fueron descritas usando una intensidad de corriente de 50 mA. La tDCS utiliza una intensidad que varía desde 1 hasta 2 mA (Kwon et al., 2018). Se desconoce si la TFS es capaz de producir efectos anticonvulsivantes a esta intensidad por lo que se diseñó el siguiente experimento.

La hipótesis del presente experimento fue que la TFS aplicada a una intensidad de corriente de 1 mA previene la expresión y reduce la severidad de una crisis convulsiva aguda generalizada.

El objetivo del presente experimento fue evaluar el efecto de la TFS aplicada a una intensidad de corriente de 1 mA en la expresión de una crisis convulsiva aguda generalizada inducida por ácido 3-mercaptopropiónico (MPA).

El MPA induce crisis convulsivas clónico-tónicas primariamente generalizadas de origen en cerebro anterior (Löscher, 1979; Velíšková et al., 2017). A diferencia de otros proconvulsivantes como el pentilinetetrazol, la picrotoxina o la estricnina, el MPA induce crisis convulsivas de una rápida progresión a crisis clónico-tónicas y de mayor severidad (Löscher, 1980; Löscher, 1979). El efecto proconvulsivante del MPA se debe a la inhibición de la enzima Glutamato Descarboxilasa y de los transportadores de GABA en las neuronas (Horton & Meldrum, 1973; Löscher, 1979). Lo anterior resulta en una disminución en los niveles tisulares de GABA en diferentes áreas cerebrales como corteza cerebral, cuerpo estriado, cerebelo, puente cerebral e hipocampo (Karlsson et al., 1974).

3.1. Metodología Experimental

3.1.1. Grupos experimentales

Veinticuatro horas después del último día de habituación los animales fueron aleatoriamente asignados a uno de los siguientes grupos experimentales (Fig. 2):

- TFS1mA-MPA (n=10). Las ratas recibieron TFS a 1 mA por 2 minutos. Cinco minutos después de finalizada la TFS, se administró MPA (37.5 mg/kg, i.p.) y se evaluaron los cambios conductuales durante 30 minutos de acuerdo con lo mencionado anteriormente ([ver sección 2.2](#)).

- MPA (n=10). Estos animales fueron manipulados y evaluados igual que el grupo anterior excepto que no recibieron TFS.

3.1.2. Análisis estadístico

Las variables categóricas están indicadas como porcentaje y las variables de intervalo están indicadas como media \pm error estándar de la media. Para determinar normalidad en los datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. Se usó la prueba exacta de Fisher de una cola o U de Mann-Whitney según fueran necesarias. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa si el valor de p era igual o menor a 0.05. Todos los análisis se realizaron en el software GraphPad versión 6 (La Jolla, California, USA).

3.2. Resultados

Todos los animales del grupo MPA (100%) presentaron crisis convulsivas menores y mayores a los 416 ± 49 y 504 ± 89 segundos, respectivamente. La máxima intensidad convulsiva alcanzada por los animales en este grupo fue de fase 5 ± 0 . Por otro lado, los animales en el grupo TFS1mA-MPA presentaron valores de prevalencia, latencia e intensidad máxima similares a los observados en el grupo MPA ($p > 0.05$, Tabla 3).

Tabla 3. Severidad e intensidad de las crisis convulsivas inducidas por Ácido 3-mercaptopropiónico y la TFS a 1 mA

| Grupo experimental | Crisis menores | | Crisis mayores | | Fase de Máxima intensidad convulsiva |
|--------------------|----------------|--------------|----------------|--------------|--------------------------------------|
| | Prevalencia | Latencia | Prevalencia | Latencia | |
| MPA | 100 | 416 ± 49 | 100 | 504 ± 89 | 5 ± 0 |
| TFS1mA-MPA | 80 | 450 ± 65 | 80 | 457 ± 66 | 4 ± 0.5 |

Los valores de la prevalencia se representan como porcentaje. Los valores de la latencia y fase máxima se presentan como promedio \pm Error estándar; MPA, Ácido 3-mercaptopropiónico; TFS, Estimulación Focal Transcraneal. Los datos de prevalencia fueron analizados por la prueba exacta de Fisher. Los datos de latencia y de fase de intensidad máxima se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney.

3.3. Discusión

Los animales en grupo MPA presentaron crisis clónico-tónicas en aproximadamente 6-7 minutos como ha sido descrito previamente por otros autores (Löscher, 1980; Löscher,

1979). La prevalencia, latencia y fase de intensidad máxima de las crisis convulsivas inducidas por la administración de MPA no se modificaron cuando los animales recibieron previamente la TFS a 1 mA. Con estos resultados se concluyó que la TFS a 1 mA no previene los cambios conductuales inducidos por el MPA.

La ausencia de efectos por la TFS aplicada antes del MPA es similar a los observados en estudios anteriores. Por un lado, la aplicación de TFS 40 minutos antes del estímulo tipo *Kindling* en amígdala no tiene efectos antiepileptogénicos (Valdés-Cruz et al., 2019). Por el otro, la aplicación de TFS previo a la administración de pilocarpina no evitó la progresión al estado epiléptico de crisis clónicas inducido por este convulsivante (Besio et al., 2013). La ausencia de efectos anticonvulsivantes por la TFS observada en el experimento 1 es similar a lo reportado en estudios previos en donde se utilizaron modelos experimentales diferentes y a una diferente intensidad de estimulación.

Es importante mencionar que las técnicas de neuroestimulación utilizadas en la clínica con eficacia ([ver sección 1.4](#)) se combinan con FAC (Fisher & Velasco, 2014). Incluso, se sugiere que los efectos anticonvulsivantes de la VNS se facilitan con la combinación con FAC en los pacientes (Arcand et al., 2017). Esta noción se apoya por evidencias en modelos animales. En el modelo de estado epiléptico de crisis clónicas inducido por pilocarpina la combinación de diazepam y TFS indujo un efecto anticonvulsivante, efecto que no se observó cuando las terapias se aplicaron de manera independiente (Besio et al., 2013). Es posible que la combinación de TFS aplicada a 1 mA con FAC induzca efectos anticonvulsivantes. Por lo anterior, se diseñó el siguiente experimento.

4. Experimento 2. Efecto de la TFS a 1 mA en combinación con FAC en la expresión de una crisis convulsiva aguda generalizada.

La hipótesis del presente experimento fue que la combinación de TFS a 1 mA con un FAC reduce la intensidad y severidad de una crisis convulsiva aguda generalizada.

El objetivo del presente experimento fue evaluar el efecto de la combinación de TFS a 1 mA con PHT sobre la intensidad y severidad de una crisis convulsiva aguda generalizada inducida por MPA.

Las crisis convulsivas inducidas por MPA son sensibles a múltiples FAC entre ellos la PHT (Löscher, 1979). La PHT es clínicamente efectiva para el control de crisis convulsivas focales y generalizadas tónico-clónicas (Abou-Khalil, 2019). Sin embargo, su uso clínico ha declinado por la introducción de nuevos FAC con mejores perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos (Abou-Khalil, 2019). Su principal mecanismo de acción es la estabilización del estado inactivo de los canales de sodio, aunque también es capaz de inhibir la conductancia al calcio y potencia la respuesta neuronal a GABA (Keppel Hesselink, 2017).

4.1. Metodología experimental

4.1.1. Grupos experimentales

Se realizaron los siguientes grupos experimentales:

- PHT-TFS1mA (n=10). Veinticuatro horas después del último día de habituación los animales recibieron PHT (75 mg/kg, i.p.). Cincuenta y tres minutos después se aplicó TFS a 1 mA por 2 minutos. Cinco minutos después del final de la TFS, se administró MPA (37.5 mg/kg, i.p.) y se registraron los cambios conductuales de acuerdo con lo descrito anteriormente ([ver sección 2.2](#)) (Fig. 2).
- PHT (n=10). Estos animales fueron manipulados igual que el grupo anterior excepto que no recibieron TFS.

Los resultados obtenidos de estos grupos se compararon con los de los grupos experimentales del experimento 1 ([ver sección 3.1.1](#)).

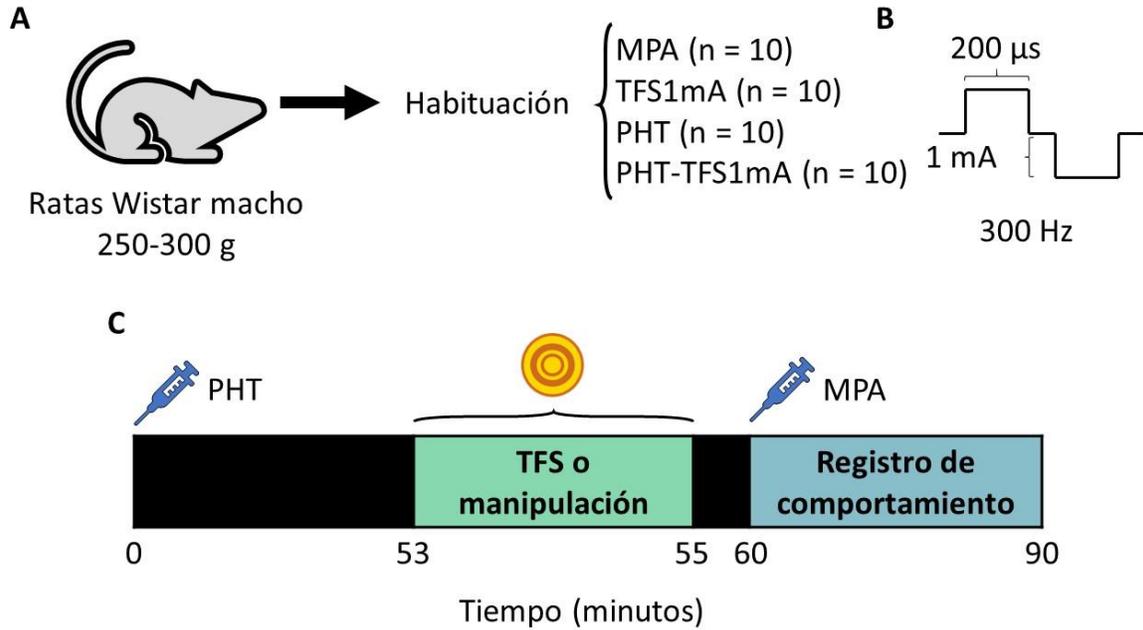


Figura 2. Diagrama del protocolo experimental (A), parámetros de la Estimulación Focal Transcraneal (TFS, B) y línea temporal de las intervenciones experimentales (C) utilizados en los experimentos 1 y 2. MPA, Ácido 3-mercaptopropiónico; PHT, Fenitoína.

4.1.2. Análisis estadístico

Las variables categóricas están indicadas como porcentaje y las variables de intervalo están indicadas como media \pm error estándar de la media. Para determinar normalidad en los datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. Se usó la prueba exacta de Fisher de una cola o Kruskal-Wallis según fueran necesarias. Como prueba post hoc se utilizó la prueba de Conover. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa si el valor de p era igual o menor a 0.05. Todos los análisis se realizaron en el software GraphPad versión 6 (La Jolla, California, USA).

4.2. Resultados

Los animales en el grupo PHT presentaron una disminución en la prevalencia de crisis menores (50%, $p = 0.02$) y mayores (30%, $p = 0.001$), en comparación con el grupo MPA. También presentaron una mayor latencia a ambos tipos de crisis convulsivas (menores 1272 ± 126 s, $p = 0.001$ y mayores 1353 ± 124 s, $p = 0.02$) en comparación con el grupo MPA (Fig. 3). Finalmente, la intensidad máxima se ubicó en una fase menor (3.1 ± 0.4 , $p = 0.004$ vs MPA) (Fig. 4).

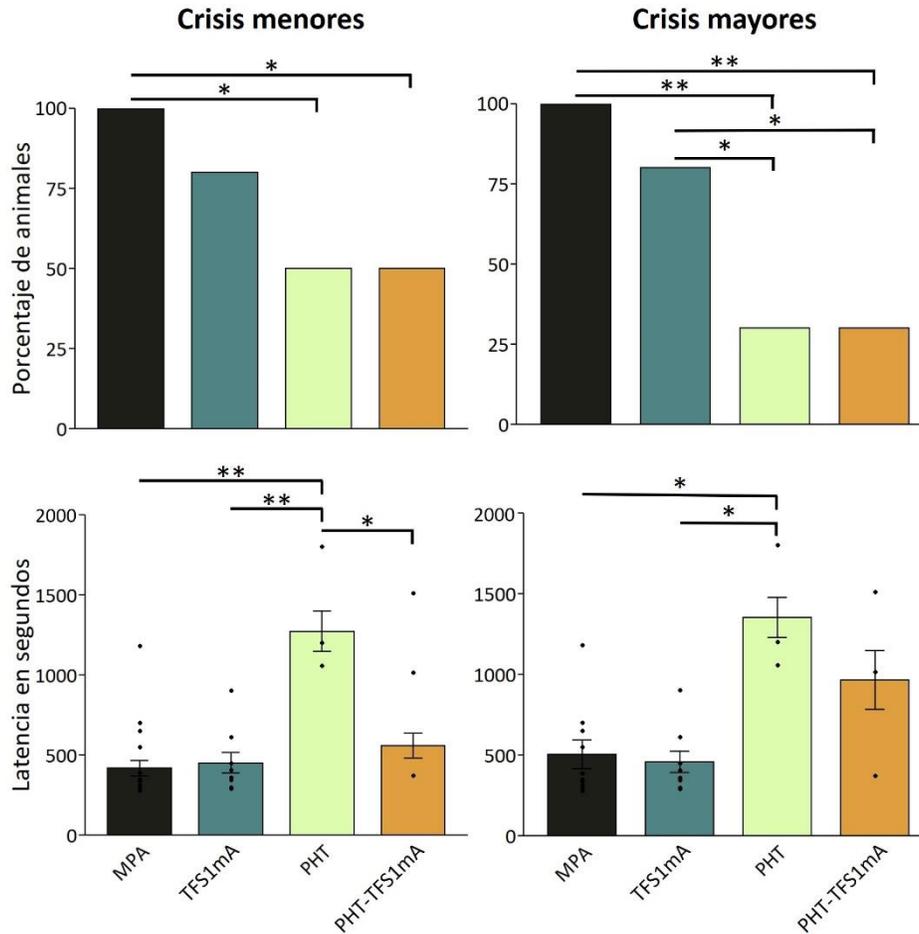


Figura 3. Prevalencia (paneles superiores) y latencia (paneles inferiores) a crisis convulsivas menores y mayores en los diferentes grupos experimentales. El Ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) fue administrado en animales sin pretratamiento; en animales que recibieron Estimulación Focal Transcraneal (TFS); en animales que recibieron Fenitoína (PHT); y en animales que recibieron PHT más TFS. Los valores de prevalencia fueron evaluados con la prueba exacta de Fisher de una cola. Los valores de latencia están presentados como la media \pm error estándar de la media y cada punto representa un valor independiente. Estos datos fueron analizados por Kruskal—Wallis seguido de la prueba de Conover. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Por otro lado, los animales en el grupo PHT-TFS1mA no presentaron cambios en la prevalencia a crisis menores (50%, $p > 0.05$) o mayores (30%, $p > 0.05$) en comparación al grupo PHT. Por otro lado, los animales del grupo PHT-TFS1mA presentaron una disminución en la latencia a crisis menores (557 ± 77 s, $p = 0.03$) y no presentaron cambios en la latencia a crisis mayores (964 ± 181 s, $p > 0.05$) en comparación al grupo PHT (Fig. 3). Los animales en grupo PHT-TFS1mA presentaron una intensidad máxima de fase 2.7 ± 0.5 la cual fue similar al grupo PHT ($p > 0.05$) (Fig. 4).

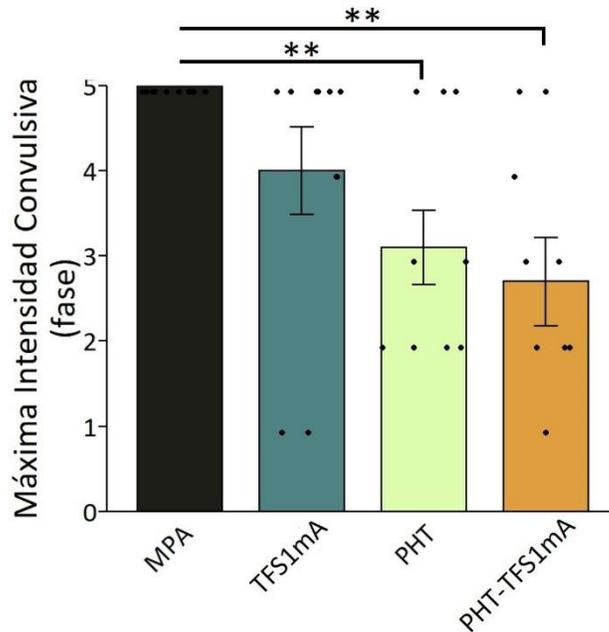


Figura 4. Máxima Intensidad Convulsiva media en los diferentes grupos experimentales. El Ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) fue administrado en animales sin pretratamiento; en animales que recibieron Estimulación Focal Transcraneal (TFS); en animales que recibieron Fenitoína (PHT); y en animales que recibieron PHT más TFS. Los valores de latencia están presentados como la media \pm error estándar de la media y cada punto representa un valor independiente. Estos datos fueron analizados por Kruskal—Wallis seguido de la prueba de Conover. $**p < 0.01$.

4.3. Discusión

En el experimento anterior se observó que la PHT reduce la severidad e intensidad de las crisis clónico-tónicas inducidas por MPA. Este efecto es similar a lo descrito por otros autores (Löscher, 1979). Por otro lado, la combinación de PHT y TFS a 1 mA no aumentó el efecto anticonvulsivante de dicho fármaco. Incluso, la combinación de TFS a 1 mA con PHT revirtió el aumento de la latencia a crisis menores que se observó en el grupo PHT. Los resultados obtenidos indican que La combinación de TFS y PHT revierte algunos efectos benéficos del fármaco y no mejora su efecto anticonvulsivante.

Se sabe que la interacción de la neuroestimulación con FAC puede ser benéfica o nociva dependiendo del mecanismo de acción de los fármacos (Rocha, 2013). La estimulación de alta frecuencia intracerebral previene la progresión a crisis clónicas y clónico-tónicas en el modelo de estado epiléptico inducido por pilocarpina. Sin embargo, al combinar esta neuroestimulación con PHT los efectos anticonvulsivantes de la neuroestimulación se revierten. Por otro lado, cuando esta neuroestimulación se combina

con fármacos que favorecen la neurotransmisión por GABA (fenobarbital o diazepam) o con gabapentina (inhibidor de los canales de calcio y de los receptores a glutamato) disminuye la prevalencia de crisis clónicas y tónico-clónicas en comparación con las terapias solas (Cuellar-Herrera et al., 2010).

Se sugiere que estrategias de neuromodulación como la de alta frecuencia, inducen sus efectos inhibitorios por aumento en la neurotransmisión por GABA la cual a su vez depende del influjo de sodio (Mantovani et al., 2006). Esto ha sido demostrado en estudios in vitro en los cuales el bloqueo de los canales de sodio inhibe la actividad eléctrica inducida por la estimulación de alta frecuencia, mientras que la activación de dichos canales aumenta el flujo GABA inducido por este mismo tipo de estimulación (Li et al 2004; Garcia et al 2003). La combinación la estimulación alta frecuencia con diazepam genera un mayor efecto anticonvulsivo en comparación a ambas terapias aplicadas de manera independiente (Cuellar-Herrera et al 2010). En relación con la TFS, cuando se aplica a 50 mA en combinación con diazepam, también disminuye la prevalencia de crisis clónicas y tónicas-clónicas en el estado epiléptico de crisis clónicas inducido por pilocarpina (Walter Besio et al., 2013). Además, estudios previos han demostrado que la TFS induce un aumento en la liberación de GABA (Santana-Gómez et al., 2015). En el presente experimento, no se observó un aumento en los efectos anticonvulsivos de la TFS a 1 mA y PHT cuando se combinaron. La ausencia de potenciación anticonvulsiva entre la TFS a 1 mA y la PHT puede ser consecuencia de la saturación del mismo mecanismo de acción. Es posible que la PHT, al bloquear los canales de sodio, bloquea la liberación de GABA inducida por la TFS. Son necesario estudios adicionales en los que se evalúe la combinación de TFS a 1 mA con fármacos que favorezcan la neurotransmisión por GABA.

La TFS a 1 mA sola o en combinación con PHT fue incapaz de modificar las características de las crisis convulsivas inducidas por MPA. Se ha descrito que el MPA induce cambios en la expresión de glutamato descarboxilasa y en los niveles de GABA en diferentes estructuras cerebrales como la corteza cerebral, el cuerpo estriado, el cerebelo, el puente cerebral y el hipocampo (Karlsson et al., 1974). De estas estructuras, el tallo cerebral y el tálamo participan en la generación de las crisis convulsivas generalizadas tónico-clónicas, similares a las inducidas por MPA (Browning & Nelson, 1986; Dabrowska et al., 2019; Velíšková & Velíšek, 2017). Es posible que el campo eléctrico generado por la TFS a 1 mA no tenga efectos en estas estructuras cerebrales relacionadas con las crisis convulsivas clónico-tónicas inducidas por MPA por su distancia al electrodo de

estimulación. Se sabe que como consecuencia de la aplicación de la neuroestimulación se genera un campo eléctrico que depende de la intensidad de corriente (Datta et al., 2008). Sobre esto, un modelo computacional desarrollado por el Dr. Walter Besio de la Universidad de Rhode Island estima que la TFS a 50 mA genera un campo eléctrico cuya intensidad teóricamente es capaz de abarcar la mitad de la cavidad craneal de la rata (datos no publicados, Fig. 5). Además, la aplicación de TFS a 103 μ A directamente sobre el cráneo de la rata genera un cambio de potencial a nivel hipocampal (Besio et al., 2011). Se esperaría que el alcance del campo eléctrico inducido por la TFS a 1 mA aplicada sobre la piel de la rata sea menor. Además, estudios previos indican que la TFS a 50 mA es capaz de prevenir la progresión a crisis tónico-clónicas inducidas por pentilenetetrazol (Besio et al., 2010). Por lo anterior se diseñó el siguiente experimento para investigar si la TFS a 50 mA, al generar un campo eléctrico más profundo, era capaz de prevenir o reducir la intensidad de las crisis convulsivas inducidas por MPA.

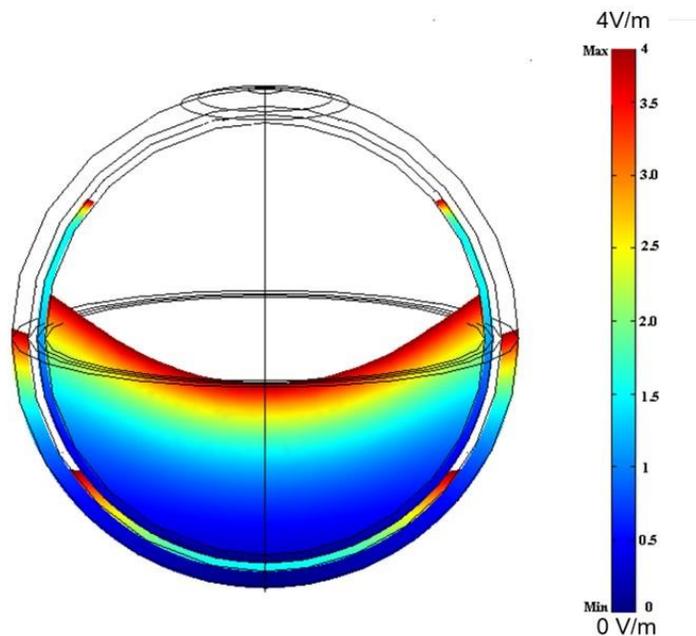


Figura 5. Modelo computacional de cuatro esferas del campo eléctrico inducido por la Estimulación Focal Transcraneal a 50 mA. El modelo se basa en cuatro esferas que representan la piel, el cráneo, el líquido cefaloraquídeo y cerebro. Los parámetros de resistencia se estimaron a partir de una rata de 200 a 250 gramos. La gama de colores representa la intensidad del campo eléctrico (V/m) y todo lo blanco representa una intensidad mayor a 4 V/m. El modelo computacional fue realizado en Comsol por el Dr. Walter Besio en la Universidad de Rhode Island.

5. Experimento 3. Efecto de la TFS a 50 mA sobre una crisis convulsiva aguda generalizada.

La hipótesis del presente experimento fue que la TFS a 50 mA reduce la intensidad y severidad de una crisis convulsiva aguda generalizada.

El objetivo fue evaluar el efecto de la TFS a 50 mA en la expresión de una crisis convulsiva aguda generalizada inducida por MPA.

5.1. Metodología experimental

5.1.1. Grupos experimentales

Los grupos experimentales para este experimento fueron iguales que los descritos para el experimento 1 ([ver sección 3.1.1](#)). Excepto que la TFS fue aplicada con una intensidad de 50 mA por 5 minutos y la muestra consistió en 6 animales por grupo.

5.1.2. Análisis estadístico

Las variables categóricas están indicadas como porcentaje y las variables de intervalo están indicadas como media \pm error estándar de la media. Para determinar normalidad en los datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. Se usó la prueba exacta de Fisher de una cola, prueba T de Student o U de Mann-Whitney según fueran necesarias. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa si el valor de p era igual o menor a 0.05. Todos los análisis se realizaron en el software GraphPad versión 6 (La Jolla, California, USA).

5.2. Resultados

Todos los animales en el grupo MPA (100%) presentaron crisis menores y mayores a los 306 ± 35 y 309 ± 35 s, respectivamente. Como fase máxima, todos los animales de este grupo presentaron crisis convulsivas fase 5. Por otro lado, del grupo TFS50mA-MPA el 83% de los animales presentaron crisis convulsivas menores y mayores. La latencia a crisis menores fue de 350 ± 34 y a crisis mayores de 404 ± 67 en este grupo. Los animales en el grupo TFS50mA-MPA presentaron crisis convulsivas con una fase de intensidad máxima de 4.3 ± 0.7 . Ninguno de estos valores fue estadísticamente diferente a los observados en el grupo MPA (Tabla 4).

Tabla 4. Severidad e intensidad de las crisis convulsivas inducidas por Ácido 3-mercaptopropiónico y la TFS a 50 mA

| Grupo experimental | Crisis menores | | Crisis mayores | | Fase de Máxima intensidad convulsiva |
|--------------------|----------------|----------|----------------|----------|--------------------------------------|
| | Prevalencia | Latencia | Prevalencia | Latencia | |
| MPA | 100 | 306 ± 35 | 100 | 309 ± 35 | 5 ± 0 |
| TFS50mA-MPA | 83 | 350 ± 34 | 83 | 404 ± 67 | 4.3 ± 0.7 |

Los valores de la prevalencia se representan como porcentaje. Los valores de la latencia y fase máxima se presentan como promedio ± Error estándar; MPA, Ácido 3-mercaptopropiónico; TFS, Estimulación Focal Transcraneal. Los datos de prevalencia fueron analizados por la prueba exacta de Fisher. Los datos de latencia fueron analizados con la prueba T de student. Los datos de fase de intensidad máxima se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney.

5.3. Discusión

La aplicación de TFS a 50 mA no modificó la severidad ni intensidad de las crisis convulsivas inducidas por el MPA. Es probable que el campo eléctrico inducido por la TFS a 50 mA (Fig. 5) tampoco alcance a proteger todas las estructuras afectadas por el MPA (Karlsson et al., 1974). Particularmente, las estructuras relacionadas con la manifestación de crisis convulsivas generalizadas tónico-clónicas, como el tallo cerebral y el tálamo (Browning & Nelson, 1986; Dabrowska et al., 2019; Eells et al., 2004). Es necesario verificar experimentalmente el alcance del campo eléctrico inducido por la TFS a diferentes intensidades.

Evidencias previas indican que la TFS a 50 mA aplicada como pretratamiento no previene la aparición ni reduce la severidad del estado epiléptico de crisis clónicas inducido por pilocarpina (Besio et al., 2013). Asimismo, la aplicación de TFS 40 minutos antes de un estímulo tipo *Kindling* no tiene efectos antiepileptogénicos (Valdés-Cruz et al., 2019). De igual manera, en el presente estudio encontramos que la aplicación de TFS a 50 mA aplicada antes de la inducción de la administración del MPA no induce efectos anticonvulsivantes. Este grupo de evidencias indican que la TFS aplicada sola como pretratamiento no induce efectos anticonvulsivantes. Sin embargo, es importante hacer notar que la aplicación de TFS a 50 mA con diazepam antes del estado epiléptico inducido por pilocarpina reduce la prevalencia de crisis clónicas y tónico-clónicas (Besio et al., 2013). Esta evidencia sugiere que la combinación de TFS a 50 mA con FAC induce efectos anticonvulsivantes.

Por otra parte, se ha descrito que los efectos de la neuromodulación dependen del estado funcional cerebral al momento de la estimulación (Huerta & Lisman, 1995; Huerta & Lisman, 1993; Zrenner et al., 2018). Al respecto, se sabe que la hiperexcitabilidad e hipersincronización cerebral inducida por el pentilinetetrazol se revierte por la aplicación de TFS (Besio et al., 2011; Besio et al., 2013; Makeyev et al., 2011). El siguiente experimento se diseñó con el propósito de investigar si la TFS a 50 mA, sola o asociada a FAC, induce efectos anticonvulsivantes en animales con hiperexcitabilidad cerebral.

6. Experimento 4. Efecto de la TFS a 50 mA sola y en combinación con FAC sobre crisis convulsivas en animales con hiperexcitabilidad cerebral.

La hipótesis del presente experimento fue que la TFS a 50 mA sola o en combinación con FAC reduce la intensidad y severidad de las crisis convulsivas en animales con hiperexcitabilidad cerebral.

El objetivo del presente experimento fue evaluar el efecto de la TFS a 50 mA sola o en combinación con PHT sobre la intensidad y severidad de una crisis convulsiva inducida en animales con hiperexcitabilidad cerebral inducida por crisis convulsivas repetitivas.

La inducción de crisis convulsivas de manera repetitiva induce un estado progresivo de hiperexcitabilidad independientemente del convulsivante utilizado (Auzmendi et al., 2013; Borbély et al., 2015; Giordano et al., 2015).

6.1. Metodología experimental

6.1.1. Inducción de crisis convulsivas repetitivas

Para la inducción de crisis convulsivas farmacorresistentes se utilizó un modelo que consiste en la administración repetitiva de MPA (Rosillo-de la Torre et al., 2015). El MPA es un inhibidor de la decarboxilasa de ácido glutámico (Karlsson et al., 1974) cuya administración resulta en la inducción de crisis convulsivas generalizadas clónico-tónicas (Löscher, 1980; Löscher, 1979).

El modelo consistió en lo siguiente: veinticuatro horas después del último día de habituación ([ver sección 2.1](#)), los animales se sometieron a la administración de MPA cada 12 horas por 10 administraciones (Rosillo-de la Torre et al., 2015) (Fig. 6). Durante 30 minutos después de cada administración se evaluaron los cambios conductuales de acuerdo con la mencionado anteriormente ([ver sección 2.2](#)). Con la finalidad de reducir la mortalidad del modelo, se optó por un incremento paulatino de las dosis de MPA (Enrique et al., 2017). El día 1, el MPA se administró a una dosis de 30 mg/kg (i.p.) y si esta dosis no era suficiente para inducir crisis mayores o iguales a fase 3, la dosis subsecuente se incrementó en 2.5 mg/kg. En caso contrario, la dosis se mantuvo igual. Este procedimiento se repitió hasta una dosis máxima de 37.5 mg/kg. Posteriormente, los animales se sometieron a un ensayo cruzado ([ver sección 6.1.2](#)).

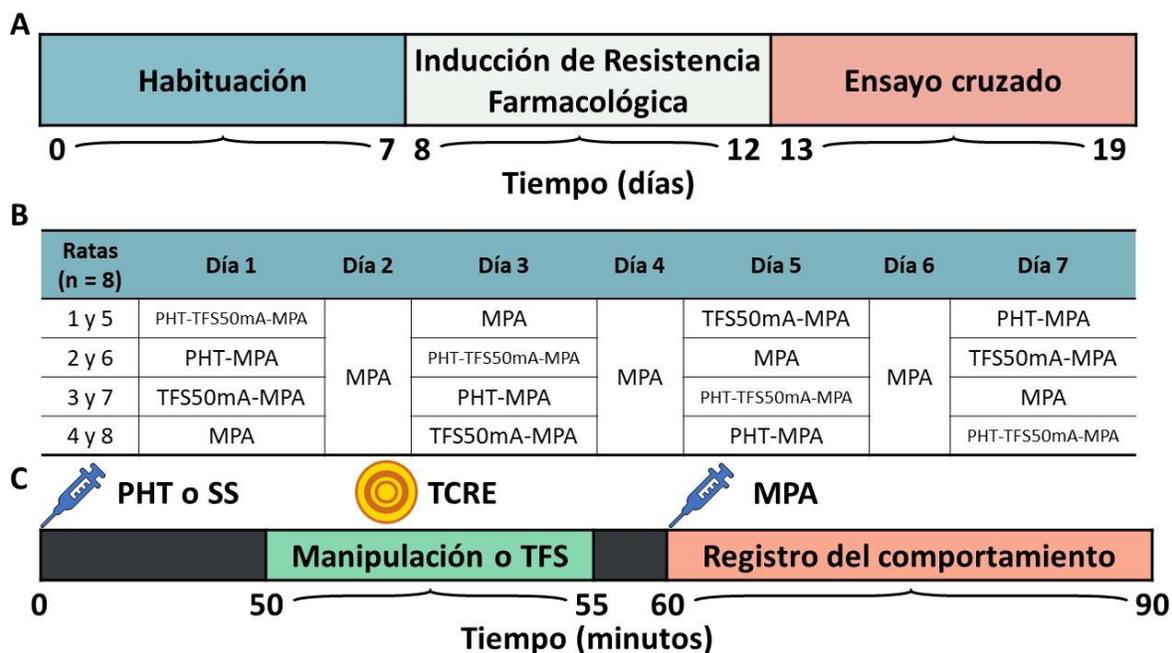


Figura 6. Diagrama del esquema experimental utilizado para evaluar los diferentes tratamientos en los animales con crisis convulsivas repetitivas. A, Línea de tiempo sobre el esquema experimental completo. Inicialmente, los animales fueron sometidos a 7 días de habituación. Posteriormente, las ratas recibieron ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) cada 12 horas por 5 días (días 8 al 12). Al día 13, los animales fueron distribuidos al ensayo cruzado. B, Esquema del ensayo cruzado para cada rata con crisis convulsivas repetitivas. Cada par de animales fue seleccionado aleatoriamente para seguir un esquema de tratamiento. Veinticuatro horas después de cada intervención terapéutica, los animales recibieron MPA para mantener las crisis convulsivas repetitivas. C, Línea de tiempo de los procedimientos para cada tratamiento aplicado durante el ensayo cruzado. Inicialmente, aplicamos fenitoína (PHT, 75 mg/kg, i.p.) o solución salina (SS, 1 ml/kg, i.p.). Después, utilizamos un electrodo tripolar de anillos concéntricos (TCRE) para aplicar estimulación focal transcraneal (TFS) o sólo manipulación durante 5 minutos. Se administró MPA (37.5 mg/kg, i.p.) 5 minutos después de finalizar la TFS o manipulación. La actividad convulsiva se evaluó durante 30 minutos después de la inyección de MPA.

6.1.2. Ensayo cruzado

El ensayo cruzado comenzó 24 horas después de la última administración de MPA y consistió en un total de 7 días de experimentación (Fig. 6). Durante los días 1, 3, 5 y 7 los animales recibieron un tratamiento experimental (ver abajo). Durante los días 2, 4 y 6 recibieron MPA (37.5 mg/kg i.p.) para mantener la hiperexcitabilidad cerebral y los efectos de las crisis convulsivas repetitivas. El ensayo cruzado nos permitió una reducción en el número de animales utilizados debido a que los resultados obtenidos permitieron evaluar la respuesta de un mismo animal a los 4 diferentes tratamientos (Grabenstatter & Dudek, 2019). Los diferentes tratamientos utilizados durante el ensayo cruzado fueron los siguientes:

- PHT-TFS50mA-MPA: Se aplicó TFS a 50 mA por 5 minutos en el cuero cabelludo de ratas pretratadas con PHT (75 mg/kg, i.p., 50 minutos antes de la TFS). Cinco minutos después del final de la TFS se administró MPA (37.5 mg/kg, i.p.). Se registró la fase máxima alcanzada y la presencia y latencia de crisis convulsivas menores y mayores durante 30 minutos de acuerdo con lo descrito antes ([ver sección 2.2](#)).
- PHT-MPA: Este tratamiento fue igual que el anterior excepto que no se aplicó TFS.
- TFS50mA-MPA: Este tratamiento fue igual que el PHT-TFS50mA-MPA excepto que recibieron SS (1 ml/kg, i.p., pH 11.4) en lugar de PHT.
- MPA: Este tratamiento fue igual que el anterior excepto que no se aplicó TFS.

6.1.3. Análisis estadístico y tamaño de la muestra

Debido a que no hay información previa sobre los efectos que esperamos, no es posible realizar un cálculo de la muestra por lo que se utilizó el recomendado para esta situación (Allgoewer & Mayer, 2017). Se consideró un mínimo de 8 sujetos por tratamiento para un análisis de variables categóricas.

Las variables categóricas están indicadas como porcentaje y las variables de intervalo están indicadas como media \pm error estándar de la media. Para determinar normalidad en los datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. Se usó la prueba exacta de Fisher de una cola, ANOVA o Kruskal Wallis según fueran necesarias. Se utilizaron evaluaciones pareadas de prueba T como prueba post hoc o la prueba de Conover según fueran necesarias. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa si el valor de p era igual o menor a 0.05. Todos los análisis se realizaron en el software GraphPad versión 6 (La Jolla, California, USA).

6.2. Resultados

El tratamiento MPA produjo crisis convulsivas menores y mayores (100%) con una latencia de 474.5 ± 84 s y 481.6 ± 83.2 s, respectivamente (Fig. 7). Además, la máxima intensidad de las crisis convulsivas en los animales bajo este tratamiento fue de fase 4.3 ± 0.2 (Fig. 8). El tratamiento TFS50mA-MPA indujo cambios similares a los inducidos por el tratamiento MPA. El 100% de los animales presentaron crisis convulsivas menores a los 474 ± 29.3 s ($p > 0.05$ vs MPA), el 85.5% presentaron crisis convulsivas mayores a los 451.1 ± 19.9 s ($p > 0.05$ vs MPA) y la fase máxima alcanzada fue de 4 ± 0.2 ($p > 0.05$ vs MPA).

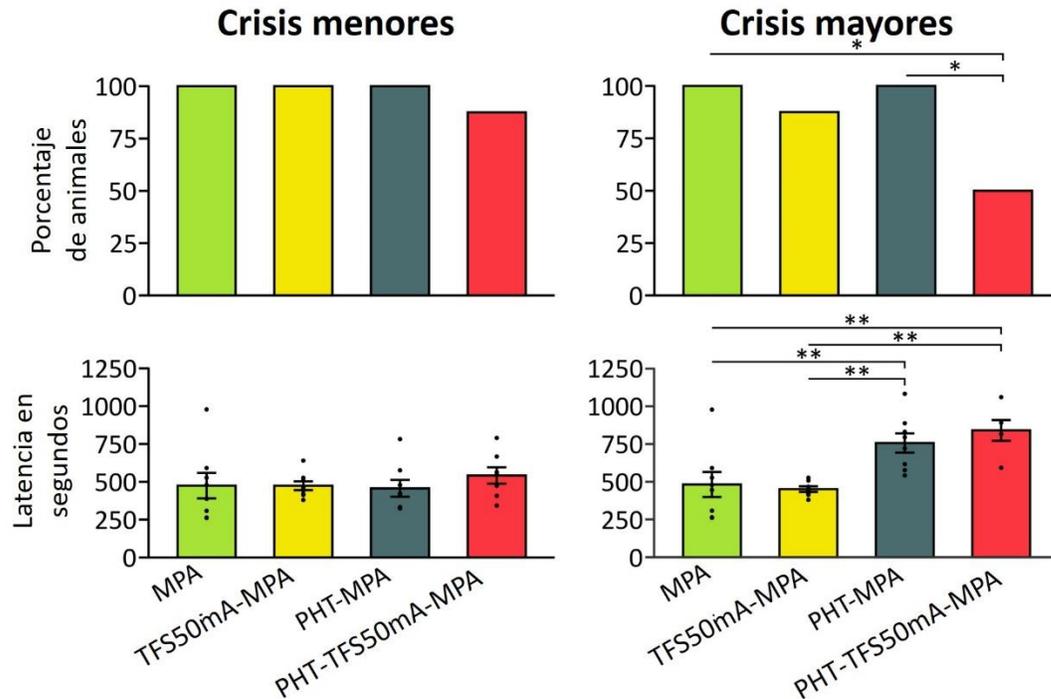


Figura 7. Prevalencia (paneles superiores) y latencia (paneles inferiores) de las crisis convulsivas menores y mayores en ratas con crisis convulsivas repetitivas bajo los distintos tratamientos: Ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) solo, Estimulación Focal Transcranial más MPA (TFS-MPA), Fenitoína más MPA (PHT-MPA) y PHT más TFS más MPA (PHT-TFS-MPA). Los valores de prevalencia fueron evaluados con la prueba exacta de Fisher de una cola. Los valores de latencia están presentados como la media \pm error estándar de la media y cada punto representa un valor independiente. Estos datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido evaluaciones pareadas por la prueba T. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

El tratamiento PHT-MPA indujo crisis convulsivas menores (100%) con una latencia de 456.6 ± 55.7 s ($p > 0.05$ vs MPA). La prevalencia de crisis convulsivas mayores bajo este tratamiento fue de 100% ($p > 0.05$) con una mayor latencia (756 ± 64 s, $p = 0.04$) en comparación al tratamiento MPA (Fig. 7). La máxima intensidad de las crisis convulsivas alcanzada bajo este tratamiento fue de fase 4.4 ± 0.2 ($p > 0.05$) similar al tratamiento MPA (Fig. 8). Finalmente, el tratamiento PHT-TFS50mA-MPA provocó los siguientes efectos: el 100% ($p > 0.05$ vs PHT-MPA) de los animales presentaron crisis convulsivas menores a los 541.7 ± 57.7 s ($p > 0.05$ vs PHT-MPA); y el 50% de los animales presentaron crisis convulsivas mayores ($p = 0.03$ vs PHT-MPA) a los 840 ± 97 s ($p > 0.05$ vs PHT-MPA). La máxima intensidad de las crisis convulsivas en los animales bajo este tratamiento fue de fase 3.2 ± 0.4 ($p = 0.02$ vs PHT-MPA) (Fig. 7 y 8).

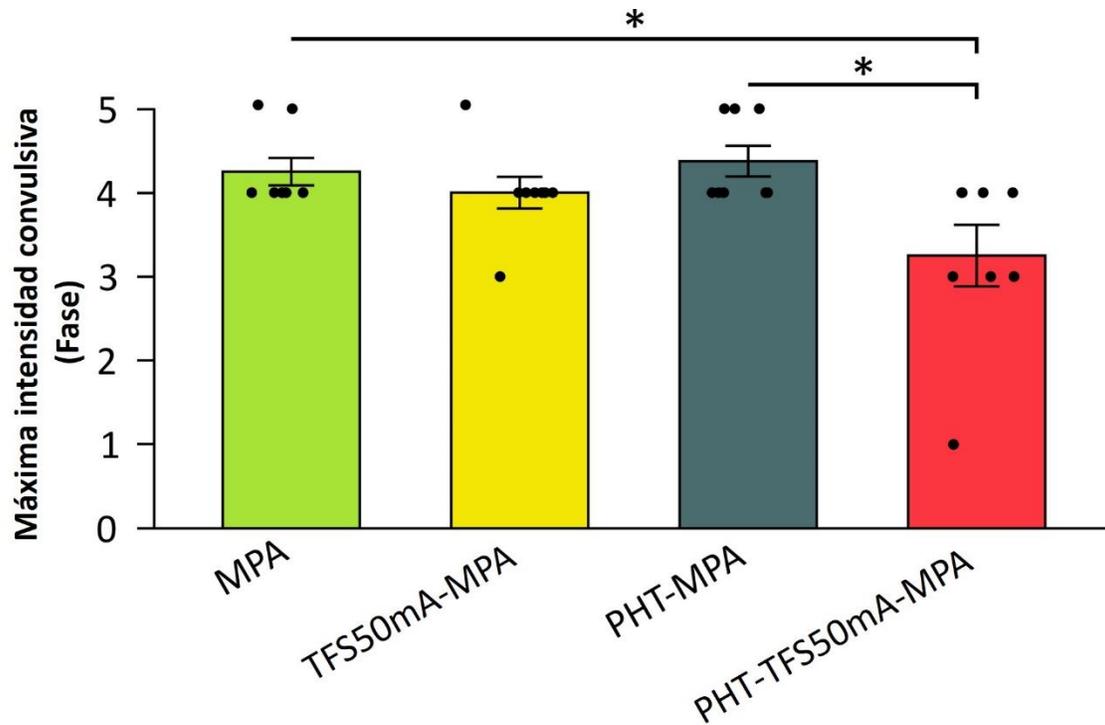


Figura 8. Representación de la máxima intensidad convulsiva alcanza por las ratas con crisis convulsivas farmacorresistentes bajo los diferentes tratamientos evaluados (ver leyenda de la figura 5). Los valores están presentados como media \pm error estándar de la media y cada punto representa un valor independiente. Estos datos fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Conover. * $p < 0.05$.

Los resultados anteriores nos permiten concluir que: I) la inducción de crisis repetidas induce resistencia a la PHT; II) la TFS sola a 50 mA no reduce la intensidad ni severidad de las crisis convulsivas inducidas en un cerebro con hiperexcitabilidad; y III) la combinación de TFS a 50 mA con PHT tiene efectos anticonvulsivos en animales que son resistentes a este fármaco.

6.3. Discusión

En el experimento anterior se observó que la TFS a 50 mA como pretratamiento no modifica la intensidad o severidad de las crisis convulsivas en un animal con hiperexcitabilidad cerebral. En la práctica clínica las terapias de neuromodulación, como la VNS, se aplican concomitantemente a FAC (Kwon et al., 2018) y se sugiere que esta combinación es importante para mantener la efectividad anticonvulsiva (Arcand et al., 2017; Révész et al., 2018). Al igual que con la VNS, la combinación de DBS con FAC ha demostrado ser efectiva en el control de crisis epilépticas clónico-tónicas generalizadas (Velasco et al., 2000; Velasco et al., 2005). Sin embargo, la combinación de fármacos con

neuroestimulación puede derivar en desenlaces distintos independientemente de que los pacientes tengan el mismo diagnóstico (Sa et al., 2019). Al igual que otras técnicas de neuromodulación, la TFS probablemente necesita combinarse con FAC para tener efectos anticonvulsivos.

Por otro lado, la administración de PHT (tratamiento PHT-MPA) tampoco modificó la intensidad ni la severidad de las crisis convulsivas repetitivas clónico-tónicas inducidas por MPA. Este efecto se explica debido a que la inducción de crisis convulsivas generalizadas (clónicas o clónico-tónicas) inducidas por MPA induce un fenotipo de farmacorresistencia. Este fenotipo genera poca o nula respuesta anticonvulsiva a FAC como la PHT (Enrique et al., 2017; Rosillo-de la Torre et al., 2015). Esta farmacorresistencia se asocia a la sobreexpresión de Pgp a nivel cerebral (Enrique et al., 2017; Lazarowski et al., 2004; Rosillo-de la Torre et al., 2015) y a los bajos niveles cerebrales de PHT (Höcht et al., 2007). El presente resultado comprueba que la inducción repetitiva de crisis generalizadas induce crisis convulsivas resistentes a PHT.

El MPA es un proconvulsivante que induce crisis convulsivas progresivamente más severas en las ratas. Las manifestaciones que se observan en este modelo van desde mioclonías hasta crisis clónico-tónicas (Löscher, 1980; Löscher, 1979). Se ha descrito que las crisis menores en este modelo ([ver sección 2.2](#)) son consecuencia de la activación de estructuras del cerebro anterior (Velišková & Velišek, 2017) y las crisis convulsivas mayores están relacionadas con estructuras centrales como el tálamo y el tallo cerebral (Browning & Nelson, 1986; Chen et al., 2019; Yang et al., 2017). En el presente experimento se encontró que la combinación de TFS a 50 mA con PHT redujo la prevalencia y prolongó la latencia de las crisis mayores sin modificar la expresión de las crisis menores. Como fue mencionado previamente, el campo eléctrico que induce la TFS a 50 mA se reduce conforme aumenta la distancia al TCRE ([ver sección 4.3](#)) (Besio et al., 2006, 2011; Valdés-Cruz et al., 2019). Es probable que los efectos de la combinación de TFS a 50 mA con PHT sobre las crisis mayores sean consecuencia de que no se propagó la crisis convulsiva al tálamo o tallo cerebral. Sin embargo, los efectos de la combinación de TFS a 50 mA con PHT o de las terapias solas no son suficientes para prevenir la activación de los circuitos responsables de las crisis menores.

Por otro lado, en el experimento 2 ([ver sección 4.2](#)) la combinación de TFS a 1 mA con PHT no aumentó los efectos de las terapias administradas independientemente. Sin embargo, en el experimento anterior se observó un aumento en el efecto anticonvulsivante

con esta misma combinación. La inducción repetitiva de crisis convulsivas generalizadas induce un aumento en la excitabilidad cerebral (Auzmendi et al., 2013; Borbély et al., 2015; Giordano et al., 2015). Es probable que los efectos de la TFS en combinación con PHT sean mejores en animales con hiperexcitabilidad cerebral que en animales intactos. Estudios previos reportan que el efecto de la neuroestimulación depende del estado de excitabilidad cerebral (Huerta & Lisman, 1995; Huerta & Lisman, 1993; Zrenner et al., 2018). Por otro lado, la inducción repetitiva de crisis convulsivas generalizadas induce un fenotipo de farmacorresistencia por la sobreexpresión de Pgp (Enrique et al., 2017; Höcht et al., 2007, 2009; Rosillo-de la Torre et al., 2015). Es probable que la TFS tenga un efecto de inhibición sobre esta proteína y revierta el fenotipo de farmacorresistencia. Estudios *in vitro* han demostrado que, bajo ciertas condiciones, la estimulación eléctrica puede inhibir la expresión y función de la Pgp (Janigro et al., 2006). Son necesarios más estudios para explicar los diferentes efectos de la combinación de TFS más PHT en las crisis convulsivas generalizadas en animales sanos en comparación con los animales con hiperexcitabilidad cerebral y farmacorresistencia.

Uno de los principales factores clínicos que se asocian a ERF, es la severidad y frecuencia de las crisis epilépticas antes de la farmacoterapia (Rogawski, 2013; Rogawski & Johnson, 2008). En nuestros resultados observamos que la combinación de PHT con TFS a 50 mA redujo la prevalencia de las crisis convulsivas mayores (conducta de escape y crisis clónico-tónicas). De la misma manera, la administración concomitante de DBS o VNS con FAC reduce la frecuencia y severidad de las crisis convulsivas en la clínica (Arcand et al., 2017; Révész et al., 2018; Velasco et al., 2000; Velasco et al., 2005). La administración de TFS a 50 mA en combinación con PHT puede representar una estrategia útil para prevenir el fenotipo farmacorresistente al reducir la prevalencia de crisis convulsivas severas.

Un aspecto para comentar del presente estudio es el ensayo cruzado. En los ensayos clínicos de este tipo se recomienda un tiempo de lavado del fármaco superior a 5 vidas medias (Evans, 2010). Según este concepto, la eliminación de una dosis de 100 mg/kg (i.p.) de PHT requiere de 13 horas ya que su vida media es de 2.6 horas en ratas (Lolin et al., 1994). En el presente estudio se utilizaron 75 mg/kg de PHT (i.p.) y hubo una separación de 48 horas entre administraciones por lo que el tiempo de lavado fue suficiente. Sin embargo, también ha sido descrito que la PHT se acumula durante su administración repetida desde 3 administraciones (Lolin et al., 1994). Al final del experimento cada uno de

los animales recibió 2 días PHT, desconocemos si este número de administraciones fueron suficientes para modificar la farmacocinética de la PHT y por eso esto es considerado como una limitación del estudio.

La farmacoresistencia que resulta de las crisis repetitivas inducidas por MPA (Enrique et al., 2017; Rosillo-de la Torre et al., 2015) se asocia a la sobreexpresión cerebral de Pgp (Lazarowski et al., 2004; Rosillo-de la Torre et al., 2015) y a una menor concentración cerebral de FAC (Höcht et al., 2007, 2009). Se sabe que la administración de fármacos inhibidores de la Pgp revierte la farmacoresistencia a PHT (Enrique et al., 2017; Höcht et al., 2007). En el presente experimento se observó que la administración de PHT más TFS (tratamiento PHT-TFS-MPA) revirtió la resistencia a PHT en el modelo de crisis repetitivas inducidas por MPA. Por otro lado, se describe que la aplicación de corriente alterna reduce la expresión y función de la Pgp en líneas celulares de cáncer (Janigro et al., 2006). Por lo anterior es posible que la TFS a 50 mA sea capaz de inhibir la expresión y función de la Pgp. El siguiente experimento se diseñó para investigar el efecto de la TFS en la expresión de Pgp secundaria a actividad convulsiva.

7. Experimento 5. Efecto de la TFS a 50 mA sobre la expresión de la Pgp inducida por una crisis convulsiva aguda generalizada

La inducción de crisis convulsivas repetitivas induce un aumento de progresivo de la expresión de Pgp, de la excitabilidad neuronal y de la farmacorresistencia (Auzmendi et al., 2013; Enrique et al., 2017; Lazarowski et al., 2004). La aplicación de estimulación eléctrica es capaz de reducir la expresión y función de la Pgp *in vitro* (Janigro et al., 2006). Por lo anterior, es posible que la TFS evite la sobreexpresión de la Pgp secundaria a la actividad convulsiva *in vivo* desde la primera crisis convulsiva.

Por otro lado, la sobreexpresión de Pgp en el cerebro de un sujeto con ERF resulta de múltiples factores. Entre estos factores destacan la sobreliberación de glutamato (Bankstahl et al., 2008; Bauer et al., 2008; Hartz et al., 2017), condiciones similares a hipoxia (Merelli et al., 2019), el estrés oxidativo (Bauer et al., 2008; van Vliet et al., 2010) y la neuroinflamación (Enrique et al., 2019). Los datos descritos anteriormente derivan de investigaciones realizadas en modelos experimentales de estado epiléptico y epilepsia. Sin embargo, en modelos experimentales de una sola crisis convulsiva también se ha descrito una sobreliberación de glutamato (Rocha et al., 1996), hipoxia (Farrell et al., 2016) y un aumento en el estrés oxidativo (Attia et al., 2019; Rauca et al., 1999) y de la neuroinflamación (Ristori et al., 2008). Por lo anterior, es posible que una sola crisis convulsiva favorezca la sobreexpresión de Pgp.

Las hipótesis del presente experimento fueron que una crisis convulsiva es capaz de inducir la sobreexpresión de la Pgp y que la TFS a 50 mA es capaz de prevenir este efecto.

Los objetivos fueron:

- Evaluar la expresión hipocampal y cortical de la Pgp posterior a una crisis convulsiva inducida por MPA.
- Analizar el efecto de la administración de TFS a 50 mA sobre la expresión hipocampal y cortical de Pgp posterior a una crisis convulsiva inducida por MPA.

7.1. Metodología experimental

7.1.1. Grupos experimentales

Veinticuatro horas después del final de la habituación los animales fueron aleatoriamente asignados a uno de los siguientes 4 grupos experimentales (Fig. 9):

- TFS50mA-MPA (n=6): Este es el mismo grupo que fue descrito en el experimento 3 ([ver sección 5.1.1](#)). Estos animales fueron sacrificados 4 horas después de la administración de MPA. Se disecaron la corteza cerebral e hipocampo para inmediatamente congelarlos y almacenarlos a -70 °C hasta su uso para determinar la expresión de Pgp por Western Blot ([ver sección 7.1.2](#)).
- MPA (n=6): Este grupo fue utilizado para determinar el efecto de la crisis convulsiva inducida por MPA sobre la expresión de Pgp. La manipulación de estos animales fue igual a la del grupo anterior, excepto que no recibieron TFS.
- TFS50mA (n=6): Este grupo fue designado para investigar los efectos de la TFS sobre el cerebro de animales intactos. Estos animales fueron manipulados como el grupo TFS50mA-MPA, excepto que en lugar de recibir MPA recibieron SS.
- SS (n=6): Los animales en este grupo fueron manipulados como el grupo anterior, excepto que no recibieron TFS. Los resultados de este grupo se consideraron la condición control para este experimento.

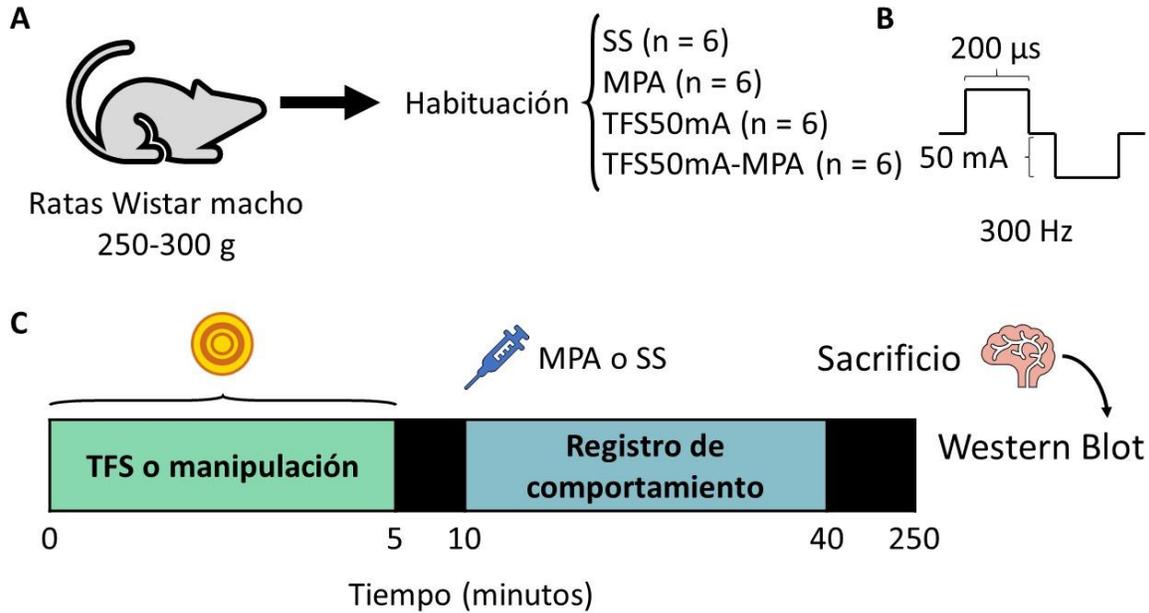


Figura 9. Diagrama del protocolo experimental utilizado para evaluar la expresión de la glicoproteína P (Pgp) después de una crisis convulsiva aguda inducida por ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) y los efectos de la estimulación focal transcraneal (TFS). A, Los animales fueron sometidos a 7 días de habituación. Entonces, se distribuyeron aleatoriamente a los diferentes grupos experimentales. B, Diagrama de los parámetros de la TFS. C, Línea de tiempo del procedimiento experimental. Se obtuvieron el hipocampo y la corteza cerebral de las ratas al final del experimento y se usaron para determinar la expresión de la Pgp por Western Blot. g, gramos; SS, Solución salina; mA, miliamperes; μ s, microsegundos; Hz, Hertz; TCRE, Electrodo tripolar de anillos concéntricos.

7.1.2. Western Blot

Las muestras de tejido cerebral se homogeneizaron en amortiguador de Ensayo de Radio Inmunoprecipitación (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM Ácido Etileno-Diamino-Tetracético y 0.1% Tritón X-100; pH 7.5) con un cóctel de inhibidores de la proteasa (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) en un baño frío (4 °C). Luego los homogeneizados se centrifugaron a 14000 g durante 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante (extracto de proteína total) se recogió inmediatamente y se congeló en alícuotas a -70 °C. La concentración total de proteínas se determinó en los extractos según el método Bradford (Laboratorios Bio-Rad, EUA) utilizando albúmina de suero bovino (Laboratorios Bio-Rad, EUA) como estándar.

Posteriormente, las muestras (50 μ g de extracto de proteína total) se hirvieron (95 °C) durante 5 minutos en amortiguador Laemmli (500 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% dodecil sulfato

de sodio (SDS, por sus siglas en inglés), 10% glicerol, 10% β -mercaptoetanol y 0.1% azul de bromofenol) para su desnaturalización. La electroforesis se llevó a cabo en amortiguador de corrida Tris/glicina/SDS (25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1% SDS; pH 8.3; Laboratorios Bio-Rad, EUA) a 85 V durante 30 min y 100 V durante 2 h utilizando un gel de SDS-poliacrilamida (7.5%). Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (Immun-Blot, Laboratorios Bio-Rad, EUA) en un sistema húmedo a 0.6 A (corriente constante) durante 30 minutos utilizando amortiguador de transferencia (25 mM Trizma-base, 250 mM glicina y 20% metanol; pH 8.3). Las membranas con proteínas se incubaron en una solución bloqueadora (5% Blot-QuickBlocker, EMD Millipore, EUA) diluida en SS amortiguada con Tris-Tween (TBS-T, por sus siglas en inglés) (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.1% Tween 20; pH 7.5) durante 1 h a 4 °C. Las membranas bloqueadas fueron lavadas en TBS-T durante 5 min y este proceso se repitió 3 veces. A continuación, las membranas se incubaron durante toda la noche con una suave agitación a 4 °C, con los siguientes anticuerpos: anti-Pgp monoclonal de conejo (1:1000; Cat. ab170904, Abcam, EUA) y anti-actina monoclonal de conejo (1:1000; Cat. ab179467; Abcam, EUA). Luego, las membranas se lavaron 3 veces en TBS-T durante 5 minutos cada una para después incubarlas durante 2 h a 4 °C con su correspondiente anticuerpo secundario (cabra anti-conejo IgG unido a peroxidasa de rábano 1:5000 y 1:10000 para Pgp y actina, respectivamente). Todos los anticuerpos primarios y secundarios fueron diluidos en amortiguador TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl; pH 7.5). Finalmente, las membranas se incubaron en una solución de peróxido/luminol (sustrato ECL de Clarity Western, Laboratorios Bio-Rad, EUA) a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los datos quimioluminiscentes se normalizaron utilizando la actina como proteína constitutiva, lo que dio como resultado una relación de expresión relativa. Esta expresión se normalizó con respecto a los valores obtenidos en el grupo SS ([ver sección 6.1.2](#)). Cada muestra se evaluó por duplicado.

7.1.3. Análisis estadístico

Se consideró un número mínimo de 6 sujetos por tratamiento. Este de acuerdo con las recomendaciones para estudios en donde no hay información previa para el cálculo del tamaño de la muestra (Allgoewer & Mayer, 2017).

Las variables categóricas están indicadas como porcentaje mientras que las variables de intervalo están indicadas como media \pm error estándar de la media. Para determinar normalidad en los datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. Se usó la prueba de ANOVA

seguida de evaluaciones pareadas de prueba T como prueba post hoc. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa si el valor de p era igual o menor a 0.05. Todos los análisis se realizaron en el software GraphPad versión 6 (La Jolla, California, USA).

7.2. Resultados

Los animales en el grupo experimental SS no mostraron cambios conductuales como consecuencia de su manipulación durante el tiempo del estudio. Su expresión hipocampal y cortical de Pgp fue considerada la condición control para futuras comparaciones (100%). Al igual que en el grupo SS, los animales en el grupo TFS50mA no tuvieron alteraciones conductuales durante su manipulación. Sin embargo, se observó un aumento en la expresión cortical de la Pgp ($67 \pm 31.1\%$, $p=0.03$ vs SS) sin cambios en la expresión hipocampal de la Pgp ($8.9 \pm 15.9\%$, $p>0.05$ vs SS).

En el grupo MPA, se observó un incremento en la expresión cortical ($68 \pm 13.4\%$, $p=0.03$) e hipocampal ($48.5 \pm 14\%$, $p=0.04$) de la Pgp en comparación al grupo SS. Finalmente, la expresión cortical e hipocampal de la Pgp en grupo TFS50mA-MPA fue similar a la observada en el grupo SS y significativamente menor a la observada en el grupo MPA (corteza cerebral $0 \pm 6\%$, $p = 0.03$; hipocampo $-11 \pm 12\%$, $p = 0.02$) (Fig. 10).

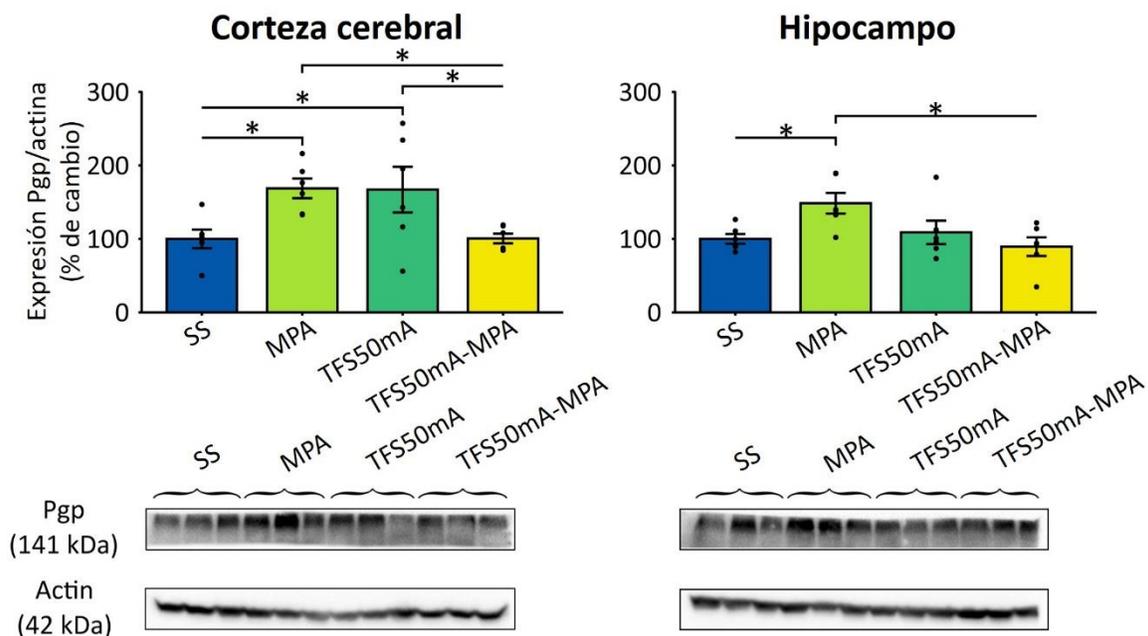


Figura 10. Representación de la expresión de la glicoproteína-P (Pgp) en la corteza cerebral y el hipocampo de los animales bajo las diferentes condiciones experimentales: vehículo (SS) o Estimulación Focal Transcralear (TFS) o después de una crisis convulsiva inducida por Ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) solo o asociado con

TFS (TFS-MPA). Las gráficas representan el cambio de la expresión Pgp/actina considerando los valores del grupo SS como la condición control (100%). Los valores se presentan como media \pm error estándar de la media y cada punto representa un valor independiente. Los valores fueron analizados con ANOVA de una vía seguido de pruebas t pareadas. Los paneles inferiores muestran bandas representativas de la expresión de Pgp bajo las diferentes condiciones experimentales. * $p < 0.05$.

7.3. Discusión

La sobreexpresión de Pgp se asocia a la farmacoresistencia en múltiples patologías entre ellas la epilepsia (Lazarowski et al., 2007). Esta sobreexpresión es consecuencia de múltiples alteraciones tales como la excesiva liberación de glutamato (Bankstahl et al., 2008; Bauer et al., 2008; Hartz et al., 2017), condiciones que simulan hipoxia (Merelli et al., 2019), estrés oxidativo (Bauer et al., 2008; van Vliet et al., 2010) y neuroinflamación (Enrique et al., 2019). La inducción repetitiva de crisis convulsivas clónico-tónicas inducidas por MPA induce la sobreexpresión cerebral de Pgp (Enrique et al., 2017; Lazarowski, Ramos, et al., 2004; Rosillo-de la Torre et al., 2015). En el presente estudio demostramos por primera vez que esta sobreexpresión está presente desde la primera crisis convulsiva inducida por MPA. Este efecto puede deberse a que posterior a una crisis convulsiva aguda existe una excesiva liberación de glutamato (Rocha et al., 1996), hipoxia (Farrell et al., 2016), la activación de la vía de la ciclooxygenasa 2/Prostaglandina E2 (Ristori et al., 2008) y un alto estrés oxidativo (Attia et al., 2019; Rauca et al., 1999). Todos estos fenómenos pueden contribuir a la sobreexpresión de Pgp encontrada posterior a una crisis convulsiva inducida por MPA.

Por otro lado, la aplicación de TFS a 50 mA generó un aumento en la expresión cortical de Pgp en animales en el grupo SS. Esto puede ser consecuencia de un aumento en la excitabilidad cortical inducida por la TFS 50 mA en animales intactos. Este efecto ha sido descrito en otros métodos de estimulación no invasiva como la TMS (Cui et al., 2017; Tang et al., 2019). Estudios previos comprueban que la TFS no induce daño cerebral (Mucio-Ramírez & Makeyev, 2017) o cambios en la memoria a corto o largo plazo (Luby et al., 2014; Rogel-Salazar et al., 2013). Sin embargo, es necesario continuar investigando las consecuencias de la TFS en sujetos sanos.

Pese a la observación anterior, la TFS a 50 mA aplicada antes del MPA previene la sobreexpresión cortical e hipocampal de Pgp inducida por la crisis convulsiva. La aplicación de TFS durante el estado epiléptico reduce la liberación de glutamato (Santana-Gómez et al., 2015). Como fue comentado previamente, esta excesiva liberación de glutamato es un

factor esencial en la sobreexpresión de Pgp (Bankstahl et al., 2008; Bauer et al., 2008; Hartz et al., 2017). Es probable que la TFS prevenga la sobreexpresión de Pgp al reducir la excesiva liberación de glutamato durante la crisis convulsiva. Además de la liberación de glutamato, la sobreexpresión de Pgp puede ser consecuencia de la liberación de mediadores inflamatorios (Enrique et al., 2019; Ristori et al., 2008). Respecto de esto, la tDCS es capaz de disminuir la liberación de interleucina 1 β en el modelo de *Kindling* químico inducido por pentilenetetrazol (Regner et al., 2020). Es probable que la TFS prevenga la sobreexpresión de Pgp inducida por una crisis convulsiva aguda inducida por MPA a través de la reducción en la liberación de mediadores inflamatorios.

8. Perspectivas y limitaciones

8.1. Perspectivas

Al momento, no se han descrito efectos adversos para la TFS. Sin embargo, su aplicación en animales intactos generó un incremento en la expresión cortical de la Pgp. Es importante estudiar la repercusión biológica de este efecto y como es su dinámica con la aplicación crónica de la TFS.

La aplicación de TFS inmediatamente después del estímulo convulsivo tiene mejores efectos en comparación a cuando se aplica como pretratamiento. Es interesante estudiar la efectividad de la TFS a diferentes intensidades como una terapia de asa cerrada. Esto se puede evaluar en modelos experimentales de epilepsia en donde los animales presentan crisis recurrentes espontáneas.

La evaluación de la TFS en modelos de epilepsia nos permitiría también evaluar su efecto como una terapia modificadora de la enfermedad o antiepiléptogénico.

Los experimentos presentados en la presente tesis apuntan a que la TFS ejerce un efecto inhibitorio de la Pgp. Es relevante cuantificar este efecto in vivo y estudiar el mecanismo por el cual logra esta inhibición.

Al momento sólo se conocen ciertos efectos de la neuromodulación en la liberación de algunos neurotransmisores. Sin embargo, estudios preliminares en nuestro laboratorio apuntan a que la TFS genera más cambios en la expresión de genes relacionados con la neuroinflamación, estrés oxidativo, neuroplasticidad y remodelación de la matriz extracelular.

La presente tesis se centró en evaluar la combinación de TFS con PHT. Sin embargo, es relevante estudiar como son los efectos de la combinación de TFS con otro tipo de FAC. En especial FAC con un mecanismo de acción diferente a la inhibición de los canales de sodio.

La epilepsia es un trastorno cerebral que comparte consecuencias patológicas con otras enfermedades neurodegenerativas. Incluso, algunas terapias de neuromodulación se usan en otros trastornos del sistema nervioso central. Sería interesante evaluar el alcance terapéutico de la TFS a otros trastornos neurológicos o psiquiátricos, como la enfermedad de Parkinson o la depresión.

8.2. Limitaciones

Una limitación del presente estudio sobre la aplicabilidad de los resultados a la práctica clínica es que los modelos que se utilizaron no representan la enfermedad humana. La carencia de crisis convulsivas espontáneas y repetitivas alejan la representación de la inducción de crisis agudas o repetitivas con la enfermedad humana.

La ausencia de una evaluación electroencefalográfica de la crisis convulsiva y su terminación constituye una limitación del presente estudio.

La otra limitación del estudio recae en que no fue posible la evaluación tisular del contenido de PHT. Por lo anterior, no podemos conocer si el aumento del efecto anticonvulsivante de la TFS en combinación con PHT fue consecuencia de la inhibición de la Pgp o algún otro efecto.

9. Referencias

- Abe, T., Seo, T., Ishitsu, T., Nakagawa, T., Hori, M., & Nakagawa, K. (2008). Association between SCN1A polymorphism and carbamazepine-resistant epilepsy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 66(2), 304–307. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2008.03203.x>
- Abou-Khalil, B. W. (2019). Update on Antiepileptic Drugs 2019. In *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology* (Vol. 25, Issue 2, pp. 508–536). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000715>
- Ahmed Juvala, I. I., & Che Has, A. T. (2020). The evolution of the pilocarpine animal model of status epilepticus. In *Heliyon* (Vol. 6, Issue 7). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04557>
- Allgoewer, A., & Mayer, B. (2017). Sample size estimation for pilot animal experiments by using a Markov Chain Monte Carlo approach. *Alternatives to Laboratory Animals : ATLA*, 45(2), 83–90. <https://doi.org/10.1177/026119291704500201>
- Amakhin, D. V., Smolensky, I. V., Soboleva, E. B., & Zaitsev, A. V. (2020). Paradoxical Anticonvulsant Effect of Cefepime in the Pentylenetetrazole Model of Seizures in Rats. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/ph13050080>
- Arcand, J., Waterhouse, K., Hernandez-Ronquillo, L., Vitali, A., & Tellez-Zenteno, J. F. (2017). Efficacy of Vagal Nerve Stimulation for Drug-Resistant Epilepsy: Is it the Stimulation or Medication? *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 44(5), 532–537. <https://doi.org/10.1017/cjn.2017.46>
- Attia, G. M., Elmansy, R. A., & Elsaed, W. M. (2019). Neuroprotective effect of nilotinib on pentylenetetrazol-induced epilepsy in adult rat hippocampus: involvement of oxidative stress, autophagy, inflammation, and apoptosis. *Folia Neuropathologica*, 57(2), 146–160. <https://doi.org/10.5114/fn.2019.84423>
- Auzmendi, J. A., Orozco-Suárez, S., Bañuelos-Cabrera, I., González-Trujano, M. E., Calixto González, E., Rocha, L., & Lazarowski, A. (2013). P-glycoprotein contributes to cell membrane depolarization of hippocampus and neocortex in a model of repetitive seizures induced by pentylenetetrazole in rats. *Current Pharmaceutical Design*, 19(38), 6732–6738. <https://doi.org/10.2174/1381612811319380006>

- Bankstahl, J. P., Hoffmann, K., Bethmann, K., & Löscher, W. (2008). Glutamate is critically involved in seizure-induced overexpression of P-glycoprotein in the brain. *Neuropharmacology*, 54(6), 1006–1016. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.02.008>
- Bauer, B., Hartz, A. M. S., Pekcec, A., Toellner, K., Miller, D. S., & Potschka, H. (2008). Seizure-Induced Up-Regulation of P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier through Glutamate and Cyclooxygenase-2 Signaling. *Molecular Pharmacology*, 73(5), 1444–1453. <https://doi.org/10.1124/mol.107.041210>
- Beghi, E., Giussani, G., Nichols, E., Abd-Allah, F., Abdela, J., Abdelalim, A., Abraha, H. N., Adib, M. G., Agrawal, S., Alahdab, F., Awasthi, A., Ayele, Y., Barboza, M. A., Belachew, A. B., Biadgo, B., Bijani, A., Bitew, H., Carvalho, F., Chaiah, Y., ... Murray, C. J. L. (2019). Global, regional, and national burden of epilepsy, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 18(4), 357–375. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30454-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30454-X)
- Begley, C. E., & Durgin, T. L. (2015). The direct cost of epilepsy in the United States: A systematic review of estimates. *Epilepsia*, 56(9), 1376–1387. <https://doi.org/10.1111/epi.13084>
- Besio, W., Sharma, V., & Spaulding, J. (2010). The Effects of Concentric Ring Electrode Electrical Stimulation on Rat Skin. *Annals of Biomedical Engineering*, 38(3), 1111–1118. <https://doi.org/10.1007/s10439-009-9891-y>
- Besio, W.G., Makeyev, O., Medvedev, A., & Gale, K. (2013). Effects of transcranial focal electrical stimulation via tripolar concentric ring electrodes on pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *Epilepsy Research*, 105(1–2), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2012.12.002>
- Besio, Walter, Cuellar-Herrera, M., Luna-Munguia, H., Orozco-Suárez, S., & Rocha, L. (2013). Effects of transcranial focal electrical stimulation alone and associated with a sub-effective dose of diazepam on pilocarpine-induced status epilepticus and subsequent neuronal damage in rats. *Epilepsy and Behavior*, 28(3), 432–436. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2013.06.021>
- Besio, Walter G., Gale, K. N., & Medvedev, A. V. (2010). Possible therapeutic effects of transcutaneous electrical stimulation via concentric ring electrodes. *Epilepsia*, 51(SUPPL. 3), 85–87. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02617.x>

Besio, Walter G., Hadidi, R., Makeyev, O., Luna-Munguia, H., & Rocha, L. (2011). Electric fields in hippocampus due to transcranial focal electrical stimulation via concentric ring electrodes. 2011 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2011, 5488–5491. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2011.6091400>

Besio, Walter G., Koka, K., Aakula, R., & Dai, W. (2006). Tri-polar concentric ring electrode development for Laplacian electroencephalography. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 53(5), 926–933. <https://doi.org/10.1109/TBME.2005.863887>

Besio, Walter G., Koka, K., & Cole, A. J. (2007). Effects of Noninvasive Transcutaneous Electrical Stimulation via Concentric Ring Electrodes on Pilocarpine-induced Status Epilepticus in Rats. *Epilepsia*, 48(12), 070725162428001-??? <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01202.x>

Besio, Walter G., Liu, X., Wang, L., Medvedev, A. V., & Koka, K. (2011). Transcutaneous focal electrical stimulation via concentric ring electrodes reduces synchrony induced by pentylentetrazole in beta and gamma bands in rats. *International Journal of Neural Systems*, 21(2), 139–149. <https://doi.org/10.1142/S0129065711002729>

Bikson, M., Esmailpour, Z., Adair, D., Kronberg, G., Tyler, W. J., Antal, A., Datta, A., Sabel, B. A., Nitsche, M. A., Loo, C., Edwards, D., Ekhtiari, H., Knotkova, H., Woods, A. J., Hampstead, B. M., Badran, B. W., & Peterchev, A. V. (2019). Transcranial electrical stimulation nomenclature. In *Brain Stimulation* (Vol. 12, Issue 6, pp. 1349–1366). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2019.07.010>

Bjørke, A. B., Nome, C. G., Falk, R. S., Gjerstad, L., Taubøll, E., & Heuser, K. (2018). Evaluation of long-term antiepileptic drug use in patients with temporal lobe epilepsy: Assessment of risk factors for drug resistance and polypharmacy. *Seizure*, 61, 63–70. <https://doi.org/10.1016/J.SEIZURE.2018.07.011>

Boon, P., De Cock, E., Mertens, A., & Trinka, E. (2018). Neurostimulation for drug-resistant epilepsy: A systematic review of clinical evidence for efficacy, safety, contraindications and predictors for response. In *Current Opinion in Neurology* (Vol. 31, Issue 2, pp. 198–210). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000534>

Borbély, S., Czégé, D., Molnár, E., Dobó, E., Mihály, A., & Világi, I. (2015). Repeated Application of 4-Aminopyridine Provoke an Increase in Entorhinal Cortex Excitability and

Rearrange AMPA and Kainate Receptors. *Neurotoxicity Research*, 27(4), 441–452. <https://doi.org/10.1007/s12640-014-9515-7>

Brandt, C., Bethmann, K., Gastens, A. M., & Löscher, W. (2006). The multidrug transporter hypothesis of drug resistance in epilepsy: Proof-of-principle in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 24(1), 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.06.014>

Brennan, G. P., & Henshall, D. C. (2018). microRNAs in the pathophysiology of epilepsy. In *Neuroscience Letters* (Vol. 667, pp. 47–52). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.01.017>

Brotis, A. G., Giannis, T., Kapsalaki, E., Dardiotis, E., & Fountas, K. N. (2019). Complications after Anterior Temporal Lobectomy for Medically Intractable Epilepsy: A Systematic Review and Meta-Analysis. In *Stereotactic and Functional Neurosurgery* (Vol. 97, Issue 2, pp. 69–82). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000500136>

Browning, R. A., & Nelson, D. K. (1986). Modification of electroshock and pentylenetetrazol seizure patterns in rats after precollicular transections. *Experimental Neurology*, 93(3), 546–556. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(86\)90174-3](https://doi.org/10.1016/0014-4886(86)90174-3)

Chang, B., & Xu, J. (2018). Deep brain stimulation for refractory temporal lobe epilepsy: a systematic review and meta-analysis with an emphasis on alleviation of seizure frequency outcome. *Child's Nervous System*, 34(2), 321–327. <https://doi.org/10.1007/s00381-017-3596-6>

Chen, C., Li, H., Ding, F., Yang, L., Huang, P., Wang, S., Jin, B., Xu, C., Wang, Y., Ding, M., Chen, Z., & Wang, S. (2019). Alterations in the hippocampal-thalamic pathway underlying secondarily generalized tonic-clonic seizures in mesial temporal lobe epilepsy: A diffusion tensor imaging study. *Epilepsia*, 60(1), 121–130. <https://doi.org/10.1111/epi.14614>

Chen, R. C., Huang, Y. H., & How, S. W. (1986). Systemic penicillin as an experimental model of epilepsy. *Experimental Neurology*, 92(3), 533–540. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(86\)90295-5](https://doi.org/10.1016/0014-4886(86)90295-5)

Chen, R., Spencer, D. C., Weston, J., & Nolan, S. J. (2016). Transcranial magnetic stimulation for the treatment of epilepsy. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2016, Issue 8). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011025.pub2>

Chen, Z., Brodie, M. J., Liew, D., & Kwan, P. (2018). Treatment Outcomes in Patients With Newly Diagnosed Epilepsy Treated With Established and New Antiepileptic Drugs. *JAMA Neurology*, 75(3), 279. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.3949>

Chong, J., Hesdorffer, D. C., Thurman, D. J., Lopez, D., Harris, R. B., Hauser, W. A., Labiner, E. T., Velarde, A., & Labiner, D. M. (2013). The prevalence of epilepsy along the Arizona-Mexico border. *Epilepsy Research*, 105(1–2), 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2012.12.006>

Cooper, Y. A., Pianka, S. T., Alotaibi, N. M., Babayan, D., Salavati, B., Weil, A. G., Ibrahim, G. M., Wang, A. C., & Fallah, A. (2018). Repetitive transcranial magnetic stimulation for the treatment of drug-resistant epilepsy: A systematic review and individual participant data meta-analysis of real-world evidence. *Epilepsia Open*, 3(1), 55–65. <https://doi.org/10.1002/epi4.12092>

Costa, R., Tamascia, M. L., Nogueira, M. D., Casarini, D. E., & Marcondes, F. K. (2012). Handling of adolescent rats improves learning and memory and decreases anxiety. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 51(5), 548–553.

Cuellar-Herrera, M., Peña, F., Alcantara-Gonzalez, D., Neri-Bazan, L., & Rocha, L. (2010). Antiepileptic drugs combined with high-frequency electrical stimulation in the ventral hippocampus modify pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Epilepsia*, 51(3), 432–437. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02315.x>

Cui, C., Song, Y., Fan, X., Guo, Q., Wang, J., & Liu, W. (2017). Excitability of the masseter inhibitory reflex after high frequency rTMS over the motor cortex: A study in healthy humans. *Archives of Oral Biology*, 82, 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.06.014>

Czornyj, L., Cáceres Guido, P., Bramuglia, G., Rodiño, A., Feria-Romero, I., & Lazarowski, A. (2018). High incidence of persistent subtherapeutic levels of the most common AEDs in children with epilepsy receiving polytherapy. *Epilepsy Research*, 148, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.09.008>

Dabrowska, N., Joshi, S., Williamson, J., Lewczuk, E., Lu, Y., Oberoi, S., Brodovskaya, A., & Kapur, J. (2019). Parallel pathways of seizure generalization. *Brain*, 142(8), 2336–2351. <https://doi.org/10.1093/brain/awz170>

Dalic, L., & Cook, M. (2016). Managing drug-resistant epilepsy: challenges and solutions. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, Volume 12, 2605–2616. <https://doi.org/10.2147/NDT.S84852>

Datta, A., Elwassif, M., Battaglia, F., & Bikson, M. (2008). Transcranial current stimulation focality using disc and ring electrode configurations: FEM analysis. *Journal of Neural Engineering*, 5(2), 163–174. <https://doi.org/10.1088/1741-2560/5/2/007>

De Oliveira Baldoni, A., Freitas-Lima, P., Alexandre, V., De Faria Mota, K., Martinez, E. Z., Sakamoto, A. C., & Pereira, L. R. L. (2018). Quality of life and adverse events of patients with drug-resistant epilepsy using lamotrigine. *Medicina (Brazil)*, 51(3), 177–188. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_710_15

Deleo, F., Quintas, R., Pastori, C., Pappalardo, I., Didato, G., Di Giacomo, R., de Curtis, M., & Villani, F. (2020). Quality of life, psychiatric symptoms, and stigma perception in three groups of persons with epilepsy. *Epilepsy and Behavior*, 110. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.107170>

Eells, J. B., Clough, R. W., Browning, R. A., & Jobe, P. C. (2004). Comparative Fos immunoreactivity in the brain after forebrain, brainstem, or combined seizures induced by electroshock, pentylentetrazol, focally induced and audiogenic seizures in rats. *Neuroscience*, 123(1), 279–292. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.08.015>

Engel, J. (2018). The current place of epilepsy surgery. *Current Opinion in Neurology*, 31(2), 192–197. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000528>

Engel, J., & Wiebe, S. (2012). Who is a surgical candidate? *Handbook of Clinical Neurology*, 108, 822–828. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52899-5.00030-7>

Englot, D. J., Rolston, J. D., Wright, C. W., Hassnain, K. H., & Chang, E. F. (2016). Rates and Predictors of Seizure Freedom with Vagus Nerve Stimulation for Intractable Epilepsy. *Neurosurgery*, 79(3), 345–353. <https://doi.org/10.1227/NEU.0000000000001165>

Enrique, A., Goicoechea, S., Castaño, R., Taborda, F., Rocha, L., Orozco, S., Girardi, E., & Bruno Blanch, L. (2017). New model of pharmaco-resistant seizures induced by 3-mercaptopropionic acid in mice. *Epilepsy Research*, 129, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2016.10.012>

Enrique, A. V., Di Ianni, M. E., Goicoechea, S., Lazarowski, A., Valle-Dorado, M. G., Costa, J. J. L., Rocha, L., Girardi, E., & Talevi, A. (2019). New anticonvulsant candidates prevent P-glycoprotein (P-gp) overexpression in a pharmaco-resistant seizure model in mice. *Epilepsy & Behavior*, 106451. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106451>

Evans, S. R. (2010). Clinical trial structures. *Journal of Experimental Stroke and Translational Medicine*, 3(1), 8–18. <https://doi.org/10.6030/1939-067X-3.1.8>

Fang, M., Xi, Z.-Q., Wu, Y., & Wang, X.-F. (2011). A new hypothesis of drug refractory epilepsy: Neural network hypothesis. *Medical Hypotheses*, 76(6), 871–876. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2011.02.039>

Farrell, J. S., Gaxiola-Valdez, I., Wolff, M. D., David, L. S., Dika, H. I., Geeraert, B. L., Rachel Wang, X., Singh, S., Spanswick, S. C., Dunn, J. F., Antle, M. C., Federico, P., & Teskey, G. C. (2016). Postictal behavioural impairments are due to a severe prolonged hypoperfusion/hypoxia event that is COX-2 dependent. *ELife*, 5(NOVEMBER2016). <https://doi.org/10.7554/eLife.19352>

Fiest, K. M., Sauro, K. M., Wiebe, S., Patten, S. B., Kwon, C.-S., Dykeman, J., Pringsheim, T., Lorenzetti, D. L., & Jetté, N. (2017). Prevalence and incidence of epilepsy. *Neurology*, 88(3), 296–303. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003509>

Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014). ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475–482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>

Fisher, R. S., Boas, W. van E., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J., Van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J. (2005). Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470–472. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x>

Fisher, R. S., & Velasco, A. L. (2014). Electrical brain stimulation for epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, 10(5), 261–270. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.59>

García-Contreras, F., Constantino-Casas, P., Castro-Ríos, A., Nevárez-Sida, A., Estrada Correa, G. del C., Carlos Rivera, F., Guzmán-Caniupan, J., Torres-Arreola, L. del P.,

Contreras-Hernández, I., Mould-Quevedo, J., & Garduño-Espinosa, J. (2006). Direct medical costs for partial refractory epilepsy in Mexico. *Archives of Medical Research*, 37(3), 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.07.005>

Geller, E. B., Skarpaas, T. L., Gross, R. E., Goodman, R. R., Barkley, G. L., Bazil, C. W., Berg, M. J., Bergey, G. K., Cash, S. S., Cole, A. J., Duckrow, R. B., Edwards, J. C., Eisenschenk, S., Fessler, J., Fountain, N. B., Goldman, A. M., Gwinn, R. P., Heck, C., Herekar, A., ... Morrell, M. J. (2017). Brain-responsive neurostimulation in patients with medically intractable mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 58(6), 994–1004. <https://doi.org/10.1111/epi.13740>

Ghosh, C., Marchi, N., Desai, N. K., Puvenna, V., Hossain, M., Gonzalez-Martinez, J., Alexopoulos, A. V., & Janigro, D. (2011). Cellular localization and functional significance of CYP3A4 in the human epileptic brain. *Epilepsia*, 52(3), 562–571. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02956.x>

Giordano, C., Vinet, J., Curia, G., & Biagini, G. (2015). Repeated 6-Hz corneal stimulation progressively increases FosB/ δ FosB levels in the lateral amygdala and induces seizure generalization to the Hippocampus. *PLoS ONE*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141221>

Goddard, G. V. (1983). The kindling model of epilepsy. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 6, Issue C, pp. 275–279). Elsevier Current Trends. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(83\)90118-2](https://doi.org/10.1016/0166-2236(83)90118-2)

González, H. F. J., Yengo-Kahn, A., & Englot, D. J. (2019). Vagus Nerve Stimulation for the Treatment of Epilepsy. In *Neurosurgery Clinics of North America* (Vol. 30, Issue 2, pp. 219–230). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2018.12.005>

Grabenstatter, H. L., & Dudek, F. E. (2019). Effect of carbamazepine on spontaneous recurrent seizures recorded from the dentate gyrus in rats with kainate-induced epilepsy. *Epilepsia*, 60(4), 636–647. <https://doi.org/10.1111/epi.14680>

Gschwind, M., & Seeck, M. (2016). Transcranial direct-current stimulation as treatment in epilepsy. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 16(12), 1427–1441. <https://doi.org/10.1080/14737175.2016.1209410>

- Guo, Y., & Jiang, L. (2010). Drug transporters are altered in brain, liver and kidney of rats with chronic epilepsy induced by lithium-pilocarpine. *Neurological Research*, 32(1), 106–112. <https://doi.org/10.1179/174313209X408954>
- Hartz, A. M. S., Pekcec, A., Soldner, E. L. B., Zhong, Y., Schlichtiger, J., & Bauer, B. (2017). P-gp protein expression and transport activity in rodent seizure models and human epilepsy. *Molecular Pharmaceutics*, 14(4), 999–1011. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00770>
- Hitiris, N., Mohanraj, R., Norrie, J., Sills, G. J., & Brodie, M. J. (2007). Predictors of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsy Research*, 75(2–3), 192–196. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.06.003>
- Höcht, C., Lazarowski, A., Gonzalez, N. N., Auzmendi, J., Opezzo, J. A. W., Bramuglia, G. F., Taira, C. A., & Girardi, E. (2007). Nimodipine restores the altered hippocampal phenytoin pharmacokinetics in a refractory epileptic model. *Neuroscience Letters*, 413(2), 168–172. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.11.075>
- Höcht, C., Lazarowski, A., Gonzalez, N. N., Mayer, M. A., Opezzo, J. A. W., Taira, C. A., & Girardi, E. (2009). Differential hippocampal pharmacokinetics of phenobarbital and carbamazepine in repetitive seizures induced by 3-mercaptopropionic acid. *Neuroscience Letters*, 453(1), 54–57. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.01.079>
- Horton, R. W., & Meldrum, B. S. (1973). Seizures induced by allylglycine, 3-mercaptopropionic acid and 4-deoxypyridoxine in mice and photosensitive baboons, and different modes of inhibition of cerebral glutamic acid decarboxylase. *British Journal of Pharmacology*, 49(1), 52–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4207045>
- Huerta, Patricio T., & Lisman, J. E. (1995). Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro. *Neuron*, 15(5), 1053–1063. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90094-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90094-2)
- Huerta, Patricio T., & Lisman, J. E. (1993). Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a Cholinergically induced rhythmic state. *Nature*, 364(6439), 723–725. <https://doi.org/10.1038/364723a0>
- Ishikawa, N., Tateishi, Y., Tani, H., Kobayashi, Y., & Kobayashi, M. (2019). Clinical profiles associated with serum perampanel concentrations in children with refractory epilepsy. *Epilepsy and Behavior*, 94, 82–86. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.02.004>

Iwahashi, M., Gomez-Tames, J., Laakso, I., & Hirata, A. (2017). Evaluation method for in situ electric field in standardized human brain for different transcranial magnetic stimulation coils. *Physics in Medicine and Biology*, 62(6), 2224–2238. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/aa5b70>

Izadi, A., Ondek, K., Schedlbauer, A., Keselman, I., Shahlaie, K., & Gurkoff, G. (2018). Clinically indicated electrical stimulation strategies to treat patients with medically refractory epilepsy. *Epilepsia Open*, 3(S2), 198–209. <https://doi.org/10.1002/epi4.12276>

Janigro, D., Perju, C., Fazio, V., Hallene, K., Dini, G., Agarwal, M. K., & Cucullo, L. (2006). Alternating current electrical stimulation enhanced chemotherapy: a novel strategy to bypass multidrug resistance in tumor cells. *BMC Cancer*, 6, 72. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-72>

Janson, M. T., & Bainbridge, J. L. (2021). Continuing Burden of Refractory Epilepsy. *Annals of Pharmacotherapy*, 55(3), 406–408. <https://doi.org/10.1177/1060028020948056>

Jobst, B. C., Kapur, R., Barkley, G. L., Bazil, C. W., Berg, M. J., Bergey, G. K., Boggs, J. G., Cash, S. S., Cole, A. J., Duchowny, M. S., Duckrow, R. B., Edwards, J. C., Eisenschenk, S., Fessler, A. J., Fountain, N. B., Geller, E. B., Goldman, A. M., Goodman, R. R., Gross, R. E., ... Morrell, M. J. (2017). Brain-responsive neurostimulation in patients with medically intractable seizures arising from eloquent and other neocortical areas. *Epilepsia*, 58(6), 1005–1014. <https://doi.org/10.1111/epi.13739>

Kalilani, L., Sun, X., Pelgrims, B., Noack-Rink, M., & Villanueva, V. (2018). The epidemiology of drug-resistant epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsia*, 59(12), 2179–2193. <https://doi.org/10.1111/epi.14596>

Karlsson, A., Fonnum, F., Malthe-Sørensen, D., & Storm-Mathisen, J. (1974). Effect of the convulsive agent 3-mercaptopropionic acid on the levels of GABA, other amino acids and glutamate decarboxylase in different regions of the rat brain. *Biochemical Pharmacology*, 23(21), 3053–3061. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(74\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(74)90281-0)

Keppel Hesselink, J. M. (2017). Phenytoin: a step by step insight into its multiple mechanisms of action—80 years of mechanistic studies in neuropharmacology. *Journal of Neurology*, 264(9), 2043–2047. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8465-4>

Khadka, N., Zannou, A. L., Zunara, F., Truong, D. Q., Dmochowski, J., & Bikson, M. (2018). Minimal Heating at the Skin Surface During Transcranial Direct Current Stimulation. *Neuromodulation*, 21(4), 334–339. <https://doi.org/10.1111/ner.12554>

Kimiskidis, V. K. (2010). Transcranial magnetic stimulation for drug-resistant epilepsies: Rationale and clinical experience. In *European Neurology* (Vol. 63, Issue 4, pp. 205–210). *Eur Neurol*. <https://doi.org/10.1159/000282735>

Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A. T., Brodie, M. J., Allen Hauser, W., Mathern, G., Moshé, S. L., Perucca, E., Wiebe, S., & French, J. (2010). Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 51(6), 1069–1077. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x>

Kwan, P., Poon, W. S., Ng, H. K., Kang, D. E., Wong, V., Ng, P. W., Lui, C. H. T., Sin, N. C., Wong, K. S., & Baum, L. (2008). Multidrug resistance in epilepsy and polymorphisms in the voltage-gated sodium channel genes SCN1A, SCN2A, and SCN3A: Correlation among phenotype, genotype, and mRNA expression. *Pharmacogenetics and Genomics*, 18(11), 989–998. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283117d67>

Kwan, P., Sills, G. J., Butler, E., Gant, T. W., & Brodie, M. J. (2003). Differential expression of multidrug resistance genes in naïve rat brain. *Neuroscience Letters*, 339(1), 33–36. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01453-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01453-2)

Kwon, C.-S. S., Ripa, V., Al-Awar, O., Panov, F., Ghatan, S., & Jetté, N. (2018). Epilepsy and Neuromodulation—Randomized Controlled Trials. *Brain Sciences*, 8(4), 69. <https://doi.org/10.3390/brainsci8040069>

Lancelin, F., Franchon, E., Kraoul, L., Garciau, I., Brovedani, S., Tabaouti, K., Landré, E., Chassoux, F., Paubel, P., & Piketty, M.-L. (2007). Therapeutic drug monitoring of levetiracetam by high-performance liquid chromatography with photodiode array ultraviolet detection: preliminary observations on correlation between plasma concentration and clinical response in patients with refractory epil. *Therapeutic Drug Monitoring*, 29(5), 576–583. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e318157032d>

Lazarowski, A., Czornyj, L., Lubienieki, F., Girardi, E., Vazquez, S., & D’Giano, C. (2007). ABC transporters during epilepsy and mechanisms underlying multidrug resistance in

refractory epilepsy. *Epilepsia*, 48(SUPPL. 5), 140–149. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01302.x>

Lazarowski, A., Massaro, M., Schteinschnaider, A., Intruvini, S., Sevlever, G., & Rabinowicz, A. (2004). Neuronal MDR-1 gene expression and persistent low levels of anticonvulsants in a child with refractory epilepsy. *Therapeutic Drug Monitoring*, 26(1), 44–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749549>

Lazarowski, A., Ramos, A. J., García-Rivello, H., Brusco, A., & Girardi, E. (2004). Neuronal and glial expression of the multidrug resistance gene product in an experimental epilepsy model. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 24(1), 77–85. <https://doi.org/10.1023/B:CEMN.0000012726.43842.d2>

Lazarowski, A., Sevlever, G., Taratuto, A., Massaro, M., & Rabinowicz, A. (1999). Tuberosclerosis associated with MDR1 gene expression and drug-resistant epilepsy. *Pediatric Neurology*, 21(4), 731–734. [https://doi.org/10.1016/S0887-8994\(99\)00074-0](https://doi.org/10.1016/S0887-8994(99)00074-0)

Lefaucheur, J. P., Antal, A., Ayache, S. S., Benninger, D. H., Brunelin, J., Cogiamanian, F., Cotelli, M., De Ridder, D., Ferrucci, R., Langguth, B., Marangolo, P., Mylius, V., Nitsche, M. A., Padberg, F., Palm, U., Poulet, E., Priori, A., Rossi, S., Schecklmann, M., ... Paulus, W. (2017). Evidence-based guidelines on the therapeutic use of transcranial direct current stimulation (tDCS). In *Clinical Neurophysiology* (Vol. 128, Issue 1, pp. 56–92). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2016.10.087>

Li, M. C. H. H., & Cook, M. J. (2018). Deep brain stimulation for drug-resistant epilepsy. *Epilepsia*, 59(2), 273–290. <https://doi.org/10.1111/epi.13964>

Liu, J., Liu, B., & Zhang, H. (2018). Surgical versus medical treatment of drug-resistant epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsy & Behavior*, 82, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.11.012>

Liu, X., Ou, S., Xu, T., Liu, S., Yuan, J., Huang, H., Qin, L., Yang, H., Chen, L., Tan, X., & Chen, Y. (2016). New differentially expressed genes and differential DNA methylation underlying refractory epilepsy. *Oncotarget*, 7(52), 87402–87416. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13642>

Lolin, Y. I., Ratnaraj, N., Hjelm, M., & Patsalos, P. N. (1994). Antiepileptic drug pharmacokinetics and neuropharmacokinetics in individual rats by repetitive withdrawal of

blood and cerebrospinal fluid: Phenytoin. *Epilepsy Research*, 19(2), 99–110. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(94\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0920-1211(94)90020-5)

Loscher, W. (1980). A comparative study of the pharmacology of inhibitors of GABA-metabolism. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 315(2), 119–128. <https://doi.org/10.1007/BF00499254>

Löscher, W. (1979). 3-Mercaptopropionic acid: convulsant properties, effects on enzymes of the gamma-aminobutyrate system in mouse brain and antagonism by certain anticonvulsant drugs, aminooxyacetic acid and gabaculine. *Biochemical Pharmacology*, 28(8), 1397–1407. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(79\)90443-x](https://doi.org/10.1016/0006-2952(79)90443-x)

Löscher, W., & Brandt, C. (2010a). High seizure frequency prior to antiepileptic treatment is a predictor of pharmacoresistant epilepsy in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 51(1), 89–97. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02183.x>

Löscher, W., & Brandt, C. (2010b). Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: Experimental approaches and translational research. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 62, Issue 4, pp. 668–700). American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003046>

Löscher, W., & Potschka, H. (2005). Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRX*, 2(1), 86–98. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.1.86>

Löscher, W., Potschka, H., Sisodiya, S. M., & Vezzani, A. (2020). Drug resistance in epilepsy: Clinical impact, potential mechanisms, and new innovative treatment options. *Pharmacological Reviews*, 72(3), 606–638. <https://doi.org/10.1124/pr.120.019539>

Löscher, W., & Schmidt, D. (2011). Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: Ways out of the current dilemma. In *Epilepsia* (Vol. 52, Issue 4, pp. 657–678). *Epilepsia*. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03024.x>

Loup, F., Wieser, H.-G., Yonekawa, Y., Aguzzi, A., & Fritschy, J.-M. (2000). Selective Alterations in GABA A Receptor Subtypes in Human Temporal Lobe Epilepsy. *The Journal of Neuroscience*, 20(14), 5401–5419. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-14-05401.2000>

Luby, M. D., Makeyev, O., & Besio, W. G. (2014). Chronic transcranial focal stimulation from tripolar concentric ring electrodes does not disrupt memory formation in rats. 2014 36th

Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 6139–6142. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2014.6945030>

Luna-Munguía, H., Orozco-Suarez, S., & Rocha, L. (2011). Effects of high frequency electrical stimulation and R-verapamil on seizure susceptibility and glutamate and GABA release in a model of phenytoin-resistant seizures. *Neuropharmacology*, 61(4), 807–814. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.05.027>

Luna-Tortós, C., Fedrowitz, M., & Löscher, W. (2008). Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein. *Neuropharmacology*, 55(8), 1364–1375. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.08.032>

Ma, A., Wang, C., Cchen, Y., & Yuan, W. (2013). P-glycoprotein alters blood-brain barrier penetration of antiepileptic drugs in rats with medically intractable epilepsy. *Drug Design, Development and Therapy*, 7, 1447–1454. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S52533>

Makeyev, O., Liu, X., Koka, K., Kay, S. M., & Besio, W. G. (2011). Transcranial focal stimulation via concentric ring electrodes reduced power of pentylenetetrazole-induced seizure activity in rat electroencephalogram. *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS, 2011*, 7560–7563. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2011.6091864>

Makeyev, O., Liu, X., Luna-Munguía, H., Rogel-Salazar, G., Mucio-Ramirez, S., Liu, Y., Sun, Y. L., Kay, S. M., & Besio, W. G. (2012). Toward a noninvasive automatic seizure control system in rats with transcranial focal stimulations via tripolar concentric ring electrodes. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, 20(4), 422–431. <https://doi.org/10.1109/TNSRE.2012.2197865>

Makeyev, O., Luna-Munguía, H., Rogel-Salazar, G., Liu, X., & Besio, W. G. (2013). Noninvasive Transcranial focal stimulation via Tripolar concentric ring electrodes lessens behavioral seizure activity of recurrent pentylenetetrazole administrations in rats. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, 21(3), 383–390. <https://doi.org/10.1109/TNSRE.2012.2198244>

Mantovani, M., Van Velthoven, V., Fuellgraf, H., Feuerstein, T. J., & Moser, A. (2006). Neuronal electrical high frequency stimulation enhances GABA outflow from human neocortical slices. *Neurochemistry International*, 49(4), 347–350. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.02.008>

Marchi, N., Hallene, K. L., Kight, K. M., Cucullo, L., Moddel, G., Bingaman, W., Dini, G., Vezzani, A., & Janigro, D. (2004). Significance of MDR1 and multiple drug resistance in refractory human epileptic brain. *BMC Medicine*, 2, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-2-37>

Martin-McGill, K. J., Jackson, C. F., Bresnahan, R., Levy, R. G., & Cooper, P. N. (2018). Ketogenic diets for drug-resistant epilepsy. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2018, Issue 11). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001903.pub4>

Merelli, A., Ramos, A. J., Lazarowski, A., & Auzmendi, J. (2019). Convulsive Stress Mimics Brain Hypoxia and Promotes the P-Glycoprotein (P-gp) and Erythropoietin Receptor Overexpression. Recombinant Human Erythropoietin Effect on P-gp Activity. *Frontiers in Neuroscience*, 13(JUL), 750. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00750>

Mishra, A., Maiti, R., Mishra, B. R., Jena, M., & Srinivasan, A. (2020). Effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on seizure frequency and epileptiform discharges in drug-resistant epilepsy: A meta-analysis. *Journal of Clinical Neurology (Korea)*, 16(1), 9–18. <https://doi.org/10.3988/jcn.2020.16.1.9>

Mucio-Ramírez, S., & Makeyev, O. (2017). Safety of the Transcranial Focal Electrical Stimulation via Tripolar Concentric Ring Electrodes for Hippocampal CA3 Subregion Neurons in Rats. *Journal of Healthcare Engineering*, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/4302810>

Neal, E. G., Chaffe, H., Schwartz, R. H., Lawson, M. S., Edwards, N., Fitzsimmons, G., Whitney, A., & Cross, J. H. (2008). The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. *The Lancet Neurology*, 7(6), 500–506. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70092-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70092-9)

Ohemeng, K. K., & Parham, K. (2020). Vagal Nerve Stimulation: Indications, Implantation, and Outcomes. In *Otolaryngologic Clinics of North America* (Vol. 53, Issue 1, pp. 127–143). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2019.09.008>

Ólafsdóttir, H. F., Bush, D., & Barry, C. (2018). The Role of Hippocampal Replay in Memory and Planning. In *Current Biology* (Vol. 28, Issue 1, pp. R37–R50). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.073>

Pakdaman, H., Amini Harandi, A., Abbasi, M., Karimi, M., Arami, M. A., Mosavi, S. A., Haddadian, K., Rezaei, O., Sadeghi, S., Sharifi, G., Gharagozli, K., Bahrami, P., Ashrafi, F., Kasmae, H. D., Ghassemi, A., Arabahmadi, M., & Behnam, B. (2016). Vagus nerve stimulation in drug-resistant epilepsy: the efficacy and adverse effects in a 5-year follow-up study in Iran. *Neurological Sciences*, 37(11), 1773–1778. <https://doi.org/10.1007/s10072-016-2661-3>

Patwardhan, R. V. (2005). Technical note: preliminary results in development of a novel intracisternal penicillin seizure model in the rat. *Frontiers in Bioscience*, 10(1–3), 3009. <https://doi.org/10.2741/1757>

Pérez-Carbonell, L., Faulkner, H., Higgins, S., Koutroumanidis, M., & Leschziner, G. (2020). Vagus nerve stimulation for drug-resistant epilepsy. *Practical Neurology*, 20(3), 189–198. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2019-002210>

Pérez-Pérez, D., Frías-Soria, C. L., & Rocha, L. (2019). Drug-resistant epilepsy: From multiple hypotheses to an integral explanation using preclinical resources. *Epilepsy & Behavior : E&B*, 106430. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.07.031>

Pérez-Pérez, D., Rocha, L., McCane, L., Williams, B., & Besio, W. (2019). Effects of Transcranial Focal Electrical Stimulation (TFS) via Tripolar Concentric Ring Electrodes (Tcres) at Low Current Intensity, Alone and Combined with Antiseizure Drugs in Rats. Poster Abstract.

https://www.aesnet.org/meetings_events/annual_meeting_abstracts/view/2421153

Potschka, H., Volk, H. A., & Löscher, W. (2004). Pharmacoresistance and expression of multidrug transporter P-glycoprotein in kindled rats. *Neuroreport*, 15(10), 1657–1661. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000134840.10390.a4>

Rambeck, B., Jürgens, U. H., May, T. W., Wolfgang Pannek, H., Behne, F., Ebner, A., Gorji, A., Straub, H., Speckmann, E. J., Pohlmann-Eden, B., & Löscher, W. (2006). Comparison of brain extracellular fluid, brain tissue, cerebrospinal fluid, and serum concentrations of antiepileptic drugs measured intraoperatively in patients with intractable epilepsy. *Epilepsia*, 47(4), 681–694. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00504.x>

Rauca, C., Zerbe, R., & Jantze, H. (1999). Formation of free hydroxyl radicals after pentylenetetrazol-induced seizure and kindling. *Brain Research*, 847(2), 347–351. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02084-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02084-3)

Regner, G. G., Torres, I. L. S., de Oliveira, C., Pflüger, P., da Silva, L. S., Scarabelot, V. L., Ströher, R., de Souza, A., Fregni, F., & Pereira, P. (2020). Transcranial direct current stimulation (tDCS) affects neuroinflammation parameters and behavioral seizure activity in pentylenetetrazole-induced kindling in rats. *Neuroscience Letters*, 735, 135162. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135162>

Remy, S., & Beck, H. (2006). Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain*, 129(1), 18–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16317026>

Remy, S., Gabriel, S., Urban, B. W., Dietrich, D., Lehmann, T. N., Elger, C. E., Heinemann, U., & Beck, H. (2003). A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy. *Annals of Neurology*, 53(4), 469–479. <https://doi.org/10.1002/ana.10473>

Remy, S., Urban, B. W., Elger, C. E., & Beck, H. (2003). Anticonvulsant pharmacology of voltage-gated Na⁺ channels in hippocampal neurons of control and chronically epileptic rats. *European Journal of Neuroscience*, 17(12), 2648–2658. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02710.x>

Révész, D., Fröjd, V., Rydenhag, B., & Ben-Menachem, E. (2018). Estimating Long-Term Vagus Nerve Stimulation Effectiveness: Accounting for Antiepileptic Drug Treatment Changes. *Neuromodulation*, 21(8), 797–804. <https://doi.org/10.1111/ner.12775>

Ristori, C., Cammalleri, M., Martini, D., Pavan, B., Casini, G., Cervia, D., & Bagnoli, P. (2008). The cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 pathway is involved in the somatostatin-induced decrease of epileptiform bursting in the mouse hippocampus. *Neuropharmacology*, 54(5), 874–884. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.01.008>

Rocha, L., Briones, M., Ackermann, R. F., Anton, B., Maidment, N. T., Evans, C. J., & Engel, J. (1996). Pentylenetetrazol-induced kindling: early involvement of excitatory and inhibitory systems. *Epilepsy Research*, 26(1), 105–113. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(96\)00046-0](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(96)00046-0)

Rocha, Luisa. (2013). Interaction between electrical modulation of the brain and pharmacotherapy to control pharmacoresistant epilepsy. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(2), 211–228. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.009>

Rogawski, M. A. (2013). The intrinsic severity hypothesis of pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 54, 33–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23646969>

Rogawski, M. A., & Johnson, M. R. (2008). Intrinsic severity as a determinant of antiepileptic drug refractoriness. *Epilepsy Currents*, 8(5), 127–130. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852835>

Rogel-Salazar, G., Luna-Munguía, H., Stevens, K. E. E., & Besio, W. G. G. (2013). Transcranial focal electrical stimulation via tripolar concentric ring electrodes does not modify the short- and long-term memory formation in rats evaluated in the novel object recognition test. *Epilepsy & Behavior*, 27(1), 154–158. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2013.01.006>

Rosillo-de la Torre, A., Zurita-Olvera, L., Orozco-Suárez, S., Garcia Casillas, P. E., Salgado-Ceballos, H., Luna-Bárceñas, G., & Rocha, L. (2015). Phenytoin carried by silica core iron oxide nanoparticles reduces the expression of pharmacoresistant seizures in rats. *Nanomedicine (London, England)*, 10(24), 3563–3577. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.173>

Sa, M., Singh, R., Pujar, S., D'Arco, F., Desai, N., Eltze, C., Hughes, E., Al Obaidi, M., Eleftheriou, D., Tisdall, M., Selway, R., Cross, J. H., Kaliakatsos, M., & Valentin, A. (2019). Centromedian thalamic nuclei deep brain stimulation and Anakinra treatment for FIRES – Two different outcomes. *European Journal of Paediatric Neurology*, 23(5), 749–754. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2019.08.001>

Salanova, V., Witt, T., Worth, R., Henry, T. R., Gross, R. E., Nazzaro, J. M., Labar, D., Sperling, M. R., Sharan, A., Sandok, E., Handforth, A., Stern, J. M., Chung, S., Henderson, J. M., French, J., Baltuch, G., Rosenfeld, W. E., Garcia, P., Barbaro, N. M., ... Fisher, R. (2015). Long-term efficacy and safety of thalamic stimulation for drug-resistant partial epilepsy. *Neurology*, 84(10), 1017–1025. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001334>

San-Juan, D., Alvarado-León, S., Barraza-Díaz, J., Davila-Avila, N. M., Ruíz, A. H., & Ansel, D. J. (2015). Prevalence of epilepsy, beliefs and attitudes in a rural community in Mexico: A door-to-door survey. *Epilepsy & Behavior*, 46, 140–143. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.03.025>

San-Juan, D., Morales-Quezada, L., Orozco Garduño, A. J., Alonso-Vanegas, M., González-Aragón, M. F., López, D. A. E., Vázquez Gregorio, R., Ansel, D. J., & Fregni, F. (2015). Transcranial direct current stimulation in epilepsy. In *Brain Stimulation (Vol. 8, Issue 3, pp. 455–464)*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2015.01.001>

Sandra E., F., Nick, A., & Alexander, Z. (1990). Handling habituation and ehlordiazepoxide have different effects on GABA and 5-HT function in the frontal cortex and hippocampus. *European Journal of Pharmacology*, 190(1–2), 229–234. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(90\)94130-P](https://doi.org/10.1016/0014-2999(90)94130-P)

Santana-Gómez, C. E., Alcántara-González, D., Luna-Munguía, H., Bañuelos-Cabrera, I., Magdaleno-Madrigal, V., Fernández-Mas, R., Besio, W., & Rocha, L. (2015). Transcranial focal electrical stimulation reduces the convulsive expression and amino acid release in the hippocampus during pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Epilepsy & Behavior*, 49, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.04.037>

Schlichtiger, J., Pekcec, A., Bartmann, H., Winter, P., Fuest, C., Soerensen, J., & Potschka, H. (2010). Celecoxib treatment restores pharmacosensitivity in a rat model of pharmacoresistant epilepsy. *British Journal of Pharmacology*, 160(5), 1062–1071. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00765.x>

Schmidt, D., & Löscher, W. (2005). Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia*, 46(6), 858–877. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.54904.x>

Sheikh, S. R., Thompson, N., Frech, F., Malhotra, M., & Jehi, L. (2020). Quantifying the burden of generalized tonic-clonic seizures in patients with drug-resistant epilepsy. *Epilepsia*, 61(8), 1627–1637. <https://doi.org/10.1111/epi.16603>

Sheinberg, R., Heyman, E., Dagan, Z., Youngster, I., Kohn, E., Gandelman-Marton, R., & Berkovitch, M. (2015). Correlation between efficacy of levetiracetam and serum levels among children with refractory epilepsy. *Pediatric Neurology*, 52(6), 624–628. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2015.01.012>

Sheng, J., Liu, S., Qin, H., Li, B., & Zhang, X. (2017). Drug-Resistant Epilepsy and Surgery. *Current Neuropharmacology*, 16(1). <https://doi.org/10.2174/1570159x15666170504123316>

Sillanpää, M., & Schmidt, D. (2009). Early seizure frequency and aetiology predict long-term medical outcome in childhood-onset epilepsy. *Brain: A Journal of Neurology*, 132(Pt 4), 989–998. <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awn357>

Silva, R., Vilas-Boas, V., Carmo, H., Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., de Lourdes Bastos, M., & Remião, F. (2015). Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation

as a therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics*, 149, 1–123.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.013>

Sisodiya, S M, Lin, W. -R., Harding, B. N., Squier, M. V, & Thom, M. (2002). Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain*, 125(1), 22–31. <https://doi.org/10.1093/brain/awf002>

Sisodiya, Sanjay M., & Thom, M. (2003). Widespread Upregulation of Drug-resistance Proteins in Fatal Human Status Epilepticus. *Epilepsia*, 44(2), 261–264.
<https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2003.42802.x>

Skarpaas, T. L., Jarosiewicz, B., & Morrell, M. J. (2019). Brain-responsive neurostimulation for epilepsy (RNS ® System). In *Epilepsy Research* (Vol. 153, pp. 68–70). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2019.02.003>

Stephen, L. J., Forsyth, M., Kelly, K., & Brodie, M. J. (2012). Antiepileptic drug combinations- Have newer agents altered clinical outcomes? *Epilepsy Research*, 98(2–3), 194–198.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.09.008>

Sun, Y., Luo, X., Yang, K., Sun, X., Li, X., Zhang, C., Ma, S., Liu, Y., & Yin, J. (2016). Neural overexpression of multidrug resistance-associated protein 1 and refractory epilepsy: a meta-analysis of nine studies. *International Journal of Neuroscience*, 126(4), 308–317.
<https://doi.org/10.3109/00207454.2015.1015724>

Sutula, T. P., & Kotloski, R. J. (2017). Kindling: A Model and Phenomenon of Epilepsy. In A. Pitkänen, P. S. Buckmaster, A. S. Galanopoulou, & S. L. Moshé (Eds.), *Models of Seizures and Epilepsy* (2nd ed., pp. 813–825). Elsevier.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128040669000559>

Tang, F., Hartz, A. M. S., & Bauer, B. (2017). Drug-Resistant Epilepsy: Multiple Hypotheses, Few Answers. *Frontiers in Neurology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00301>

Tang, Z. M., Xuan, C. Y., Li, X., Dou, Z. L., Lan, Y. J., & Wen, H. M. (2019). Effect of different pulse numbers of transcranial magnetic stimulation on motor cortex excitability: Single-blind, randomized cross-over design. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 25(11), 1277–1281.
<https://doi.org/10.1111/cns.13248>

Tate, S. K., Depondt, C., Sisodiya, S. M., Cavalleri, G. L., Schorge, S., Soranzo, N., Thom, M., Sen, A., Shorvon, S. D., Sander, J. W., Wood, N. W., & Goldstein, D. B. (2005). Genetic

predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the anti-epileptic drugs carbamazepine and phenytoin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(15), 5507–5512. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407346102>

Theodore, W. H., & Fisher, R. S. (2004). Brain stimulation for epilepsy. In *Lancet Neurology* (Vol. 3, Issue 2, pp. 111–118). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(03\)00664-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(03)00664-1)

Thomson, S. (2013, January 24). Neuromodulation Defined. International Neuromodulation Society. <https://www.neuromodulation.com/neuromodulation-defined>

Tishler, D. M., Weinberg, K. I., Hinton, D. R., Barbaro, N., Annett, G. M., & Raffel, C. (1995). MDR1 Gene Expression in Brain of Patients with Medically Intractable Epilepsy. *Epilepsia*, 36(1), 1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1995.tb01657.x>

Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., Olsson, I. M., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigyrto, C. A.-K. A. K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., ... Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347(6220), 1260419–1260419. <https://doi.org/10.1126/science.1260419>

Valdés-Cruz, A., Villasana-Salazar, B., Williams, B., Martínez-Vargas, D., Magdaleno-Madrigal, V. M., Almazán-Alvarado, S., & Besio, W. G. (2019). Transcranial focal electrical stimulation via concentric ring electrodes in freely moving cats: Antiepileptogenic and postictal effects. *Experimental Neurology*, 320, 113012. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113012>

Van der Weide, J., Steijns, L. S. W., Van Weelden, M. J. M., & De Haan, K. (2001). The effect of genetic polymorphism of cytochrome P450 CYP2C9 on phenytoin dose requirement. *Pharmacogenetics*, 11(4), 287–291. <https://doi.org/10.1097/00008571-200106000-00002>

Van Vliet, E. A., Van Schaik, R., Edelbroek, P. M., Voskuyl, R. A., Redeker, S., Aronica, E., Wadman, W. J., & Gorter, J. A. (2007). Region-specific overexpression of P-glycoprotein at the blood-brain barrier affects brain uptake of phenytoin in epileptic rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(1), 141–147. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.121178>

van Vliet, Erwin A., Zibell, G., Pekcec, A., Schlichtiger, J., Edelbroek, P. M., Holtman, L., Aronica, E., Gorter, J. A., & Potschka, H. (2010). COX-2 inhibition controls P-glycoprotein expression and promotes brain delivery of phenytoin in chronic epileptic rats. *Neuropharmacology*, 58(2), 404–412. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.09.012>

Velasco, F., Velasco, M., Jiménez, F., Velasco, A. L., Brito, F., Rise, M., & Carrillo-Ruiz, J. D. (2000). Predictors in the treatment of difficult-to-control seizures by electrical stimulation of the centromedian thalamic nucleus. *Neurosurgery*, 47(2), 295–305. <https://doi.org/10.1097/00006123-200008000-00007>

Velasco, Francisco, Carrillo-Ruiz, J. D., Brito, F., Velasco, M., Velasco, A. L., Marquez, I., & Davis, R. (2005). Double-blind, randomized controlled pilot study of bilateral cerebellar stimulation for treatment of intractable motor seizures. *Epilepsia*, 46(7), 1071–1081. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.70504.x>

Velíšková, J., Shakarjian, M. P., & Velíšek, L. (2017). Systemic Chemoconvulsants Producing Acute Seizures in Adult Rodents. In *Models of Seizures and Epilepsy: Second Edition* (pp. 491–512). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804066-9.00035-3>

Velíšková, J., & Velíšek, L. (2017). Chapter 9 - Behavioral Characterization and Scoring of Seizures in Rodents. In A. Pitkänen, P. S. Buckmaster, A. S. Galanopoulou, & S. L. B. T.-M. of S. and E. (Second E. Moshé (Eds.), *Models of Seizures and Epilepsy* (2nd ed., pp. 111–123). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804066-9.00009-2>

Velísková, J., Velíšek, L., Mares, P., & Rokyta, R. (1990). Ketamine suppresses both bicuculline- and picrotoxin-induced generalized tonic-clonic seizures during ontogenesis. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 37(4), 667–674. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(90\)90544-r](https://doi.org/10.1016/0091-3057(90)90544-r)

Volk, H. A., & Löscher, W. (2005). Multidrug resistance in epilepsy: rats with drug-resistant seizures exhibit enhanced brain expression of P-glycoprotein compared with rats with drug-responsive seizures. *Brain: A Journal of Neurology*, 128(Pt 6), 1358–1368. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15716304>

Vöröslakos, M., Takeuchi, Y., Brinyiczki, K., Zombori, T., Oliva, A., Fernández-Ruiz, A., Kozák, G., Kincses, Z. T., Iványi, B., Buzsáki, G., & Berényi, A. (2018). Direct effects of

transcranial electric stimulation on brain circuits in rats and humans. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02928-3>

Wiebe, S., & Jette, N. (2012). Pharmacoresistance and the role of surgery in difficult to treat epilepsy. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 8, Issue 12, pp. 669–677). *Nat Rev Neurol*. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.181>

Wiley, J. D., & Webster, J. G. (1982). Analysis and Control of the Current Distribution under Circular Dispersive Electrodes. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, BME-29(5), 381–385. <https://doi.org/10.1109/TBME.1982.324910>

Yakusheva, E. N., & Titov, D. S. (2018). Structure and Function of Multidrug Resistance Protein 1. *Biochemistry (Moscow)*, 83(8), 907–929. <https://doi.org/10.1134/S0006297918080047>

Yang, L., Li, H., Zhu, L., Yu, X., Jin, B., Chen, C., Wang, S., Ding, M., Zhang, M., Chen, Z., & Wang, S. (2017). Localized shape abnormalities in the thalamus and pallidum are associated with secondarily generalized seizures in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 70, 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.02.011>

Ye, F., Li, X.-J., Jiang, W.-L., Sun, H.-B., & Liu, J. (2015). Efficacy of and Patient Compliance with a Ketogenic Diet in Adults with Intractable Epilepsy: A Meta-Analysis. *Journal of Clinical Neurology*, 11(1), 26. <https://doi.org/10.3988/jcn.2015.11.1.26>

Yue, X., Liu, X., Chen, S., & Li, R. (2018). Study of peripheral blood multidrug resistance-associated protein 1 expression of children intractable epilepsy. *Minerva Pediatrica*, 70(2), 145–150. <https://doi.org/10.23736/S0026-4946.16.04358-9>

Zangiabadi, N., Ladino, L. Di., Sina, F., Orozco-Hernández, J. P., Carter, A., & Téllez-Zenteno, J. F. (2019). Deep brain stimulation and drug-resistant epilepsy: A review of the literature. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 10, Issue JUN). *Frontiers Media S.A.* <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00601>

Zhang, C., Kwan, P., Zuo, Z., & Baum, L. (2012). The transport of antiepileptic drugs by P-glycoprotein. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 64, Issue 10, pp. 930–942). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.003>

Zrenner, C., Desideri, D., Belardinelli, P., & Ziemann, U. (2018). Real-time EEG-defined excitability states determine efficacy of TMS-induced plasticity in human motor cortex. *Brain Stimulation*, 11(2), 374–389. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2017.11.016>