



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

Eficacia de la dapsona administrada sola o en combinación
con diazepam para inhibir el *status epilepticus* en ratas

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ANA CRISTINA FARFÁN BRISEÑO

TUTOR:

SARA DEL CARMEN CABALLERO CHACÓN

COMITÉ TUTORAL:

LUIS CAMILO RÍOS CASTAÑEDA
MARÍA DE LOS ÁNGELES ARACELI DÍAZ RUIZ

Dedicatorias

Quiero dedicar esta tesis al amor de mi vida César Uribe Salinas, porque siempre conté con tu apoyo, tus consejos, tu paciencia y por impulsarme en los momentos difíciles.

A mis padres por todo su amor, por sacarme adelante y darme una carrera, gracias a ustedes hoy puedo ver alcanzada mi meta, los amo.

Agradecimientos

Sobre todo quiero agradecerles a mis tutores Sara Caballero, Camilo Ríos y Araceli Díaz por su paciencia, orientación, disposición y apoyo para terminar este trabajo con éxito, ya que sin ustedes jamás lo hubiera logrado.

Gracias al Dr. Manjarrez por su orientación en el laboratorio y por sus palabras de aliento antes de cada examen o exposición.

Mireya muchas gracias por tu apoyo incondicional, por tu tiempo y amistad.

Gracias Dra. Maricela Méndez por su tiempo y ayuda en el estudio de histología.

Eficacia de la dapsona administrada sola o en combinación con diazepam para inhibir el *status epilepticus* en ratas

Resumen

Introducción: La epilepsia constituye uno de los problemas neurológicos más comunes, se estima que afecta al 2% de la población mundial y se define como una afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis recurrentes. El *status epilepticus* (SE) es una complicación grave de la epilepsia. En la actualidad no existe un tratamiento seguro y eficaz para detener el SE, y solo se cuenta con el diazepam que al ser administrado en altas dosis, genera efectos adversos importantes, por lo que es necesario realizar estudios de seguridad e interacción de fármacos para probar nuevos tratamiento con mayor seguridad y posible efecto anti-convulsivo como es el caso de la dapsona. **Objetivo:** Evaluar la capacidad de la dapsona para inhibir el SE administrada sola o en combinación con el diazepam en un modelo ácido kaínico (AK) en ratas, utilizando video-electroencefalografía (VEEG). **Materiales y Métodos:** Se utilizaron ratas Wistar y se registró la actividad eléctrica cerebral por medio de VEEG. Fueron divididas en cuatro grupos: AK+vehículo, AK+dapsona, AK+diazepam y AK+dapsona+diazepam, los animales recibieron 12mg/kg de AK y 90 minutos después se les administraron 25mg/kg de dapsona y/o 20mg/kg de diazepam. Durante este tiempo se observaron las alteraciones conductuales, posteriormente se realizó análisis histológico para observar neuroprotección **Resultados:** La evaluación de la actividad eléctrica convulsiva en el VEEG realizada 24h después de la administración del AK mostró una reducción del 90.04% con el grupo de AK+dapsona+diazepam. El 100% de las ratas tratadas con dapsona sola o en combinación con el diazepam no mostraron alteraciones conductuales y fue el mejor tratamiento neuroprotector **Discusión y Conclusiones:** Los resultados demuestran que la dapsona administrada sola o en combinación con diazepam controla el SE, este es el primer estudio que reporta eficacia terapéutica para el control del SE por lo que podría ser un tratamiento eficaz en perros.

Palabras clave: epilepsia, *status epilepticus*, ácido kaínico, dapsona, diazepam, ratas.

Efficacy of the dapson administered alone or in combination with diazepam for inhibiting *status epilepticus* in rats

Summary

Introduction: Epilepsy is one of the most common neurological problems, is estimated to affect 2% of world population and is defined as a chronic condition of diverse etiology, characterized by recurrent seizures. *Status epilepticus* (SE) is a serious complication of epilepsy. At present there is no safe and effective treatment to stop the SE, and only has to diazepam when given in high doses, produces significant adverse effects, so it is necessary to assess the safety and interaction of drugs to test further treatment with greater security and anti-convulsive possible effect as in the case of dapson. **Objective:** To evaluate the ability of dapson to inhibit SE administered alone or in combination with diazepam in a kainic acid model (AK) in rats using video-electroencephalography (VEEG). **Materials and Methods:** Wistar rats and recorded brain electrical activity via VEEG. They were divided into four groups: AK+Vehicle, AK+dapson, AK+diazepam and AK+dapson+diazepam, the animals received 12 mg/kg of AK and 90 minutes later were given 25mg/kg of dapson and/or 20mg/kg of diazepam. During this time there were behavioral disturbances later histological analysis was performed to observe neuroprotection **Results:** The evaluation of seizure electrical activity in the vEEG performed 24 h after administration of AK, showed a reduction of 90.04% with the group of AK + dapson + diazepam. A 100% of the rats treated with dapson alone or in combination with diazepam showed no behavioral changes showing to be the best treatment and neuroprotective **Discussion and Conclusions:** The results demonstrate that dapson administered alone or in combination with diazepam, controls the SE. This is the first study reporting therapeutic efficacy for the control of SE so it could be an effective treatment in dogs.

Keywords: epilepsy, *status epilepticus*, kainic acid, dapson, diazepam, rats.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema	6
1.3 Hipótesis	6
1.4 Objetivos	6
2. MATERIALES Y MÉTODOS	7
2.1 Animales	7
2.2 Implantación de electrodos	7
2.3 Tratamientos farmacológicos	7
2.3 Análisis del VEEG	8
2.4 Análisis conductual	8
2.6 Histología	9
3. RESULTADOS	10
3.1 Supervivencia	10
3.2 Actividad eléctrica convulsiva (AEC)	12
3.3 Alteraciones conductuales evaluados con la escala de Racine	15
3.4 Efecto neuroprotector de la DDS administrada sola o en combinación con DZP evaluado con base en la cantidad de células piramidales del hipocampo viables	17
4. DISCUSIÓN	23
5. CONCLUSIÓN	26
SIGLAS	27

6. REFERENCIAS	28
7. ANEXOS	33
Anexo I. Clasificación de epilepsia, causas y pruebas diagnósticas en perros.	33
Anexo II. Fármacos antiepilépticos utilizados en perros	34
Anexo III. Fármacos utilizados para detener el SE en perros	35
Anexo IV. Características físico-químicas y propiedades terapéuticas de la Dapsona.	36
Anexo V. Modelos estandarizados con ácido kaínico en ratas.	37
Anexo VI. Niveles basales en el VEEG	38
Anexo VII. Comienzo de la AEC	39
Anexo VIII. VEEG del <i>status epilepticus</i> (SE)	40
Anexo IX. Estructura química de la Dapsona y la Zonisamida	41

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Probabilidad de supervivencia después de los tratamientos	11
Gráfica 2. Alteraciones conductuales evaluados con la escala de Racine durante 2.5h post-tratamiento y 24 h después de administrar AK	16
Gráfica 3. Densidad del área CA3 del hipocampo	21
Gráfica 4. Severidad del daño neuronal evaluado con la escala semi-cuantitativa de Brandt	22

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. AEC post- tratamiento	13
Figura 2. Imágenes representativas del área CA3 del hipocampo	19

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Efecto de los tratamientos en la AEC del VEEG

14

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La epilepsia constituye uno de los problemas neurológicos más comunes que afecta del 1% al 2% de la población mundial humana. De acuerdo con la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) la epilepsia se define como una afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis recurrentes debidas a una descarga excesiva de las neuronas cerebrales (López-Hernandez *et al.*, 2005). La convulsión es un problema de la función cerebral con características de paroxismo transitorio con tendencia recurrente y terminación espontánea. El SE es una serie de convulsiones que duran entre 20 y 30 minutos, que es la estimación del tiempo necesario para causar daño cerebral, también se considera SE a dos o más convulsiones discretas sin recuperación total de la conciencia entre convulsiones (Goiz *et al.*, 2008).

Al igual que en los humanos, en los perros ocurre algo similar, se considera que la epilepsia es el problema neurológico más común (Goiz *et al.*, 2008; Berendt 2004; Chandler 2004). Las convulsiones se presentan en el 14% de de perros con signos neurológicos; el 80% de éstos padecen epilepsia idiopática (Bollinger y Kline 2000). Se estima que hasta un 5% de la población canina mundial está afectada (Patterson 2004). El promedio de vida de un perro sano es de 12 años de edad mientras que el de los perros que se sacrifican por eutanasia o mueren por la condición epiléptica se reduce a un promedio de 2.3 años (Berendt *et al.*, 2007). Esto debido a la alta prevalencia de resistencia al tratamiento o refractariedad con los fármacos anticonvulsivos de primera elección como el fenobarbital y el bromuro de potasio la cual es del 20 al 30% (Podell y Fenner 1993). El incremento de dosis de dichos fármacos puede ser efectiva, pero en ocasiones no es posible debido a los efectos secundarios y toxicidad que pueden causar (Dewey 2006). Aunado a dicha problemática, la mayoría de los fármacos anticonvulsivos utilizados con éxito en pacientes

epilépticos humanos, no pueden ser administrados en perros, ya sea por diferencias en la farmacocinética, o debido a que producen hepatotoxicidad (Podell 1998).

Si bien el promedio de vida en los perros convulsivos es bajo, en un estudio realizado en la Universidad de Carolina del Norte, EUA se demostró que el 59% de los perros convulsivos tienen por lo menos un episodio de SE y el 32% de ellos mueren; además de que el tratamiento temprano anticonvulsivo no disminuye el riesgo de presentar SE (Saito *et al.*, 2001).

Es importante aclarar que se desconoce el mecanismo preciso de la epileptogénesis. Las convulsiones son resultado de un aumento en la excitabilidad y sincronización neuronal. Los cambios en la excitabilidad normal de los circuitos neuronales por aumento de excitación recurrente, o deficiente inhibición pueden propiciar actividad epileptiforme (March 1998). Se ha descubierto que el cerebro epiléptico tiene receptores GABAérgicos con comportamiento anormal que impiden la transmisión inhibitoria. La actividad anormal genera cambios plásticos en los circuitos corticales estos factores son fundamentales para la patogenia de la enfermedad. Se reconoce que las convulsiones sin control pueden ocasionar excitotoxicidad. Esto es que las convulsiones repetidas e intensas dañan a otros grupos neuronales. Lo anterior se debe, al menos en parte, a la habilidad del glutamato y a compuestos relacionados con éste para destruir neuronas por transmisión sináptica excitatoria prolongada (Goiz *et al.*, 2008). El GABA es el neurotransmisor inhibitorio más importante en el cerebro y ocasiona PPSI cuando se liga a los receptores GABA. Los receptores GABA_B se encuentran ligados a canales de potasio en las dendritas, también existen canales para potasio dependientes de calcio en los procesos axonales y dendríticos. Asimismo, en el soma canales para cloro unidos a receptores GABA_A provocan hiperpolarización rápida por entrada de cloro a la célula causando un PPSI (March 1998; Goiz *et al.*, 2008).

Se ha observado que en la transición de una convulsión única a SE autosostenido, los receptores GABA_A se mueven de la membrana sináptica al citoplasma, donde no poseen

actividad funcional. Esto reduce el número de receptores GABA_A disponibles para que se una el GABA o fármacos GABAérgicos y puede explicar la resistencia farmacológica a las benzodiazepinas (Chen *et al.*, 2007). También hay subunidades de receptores AMPA y NMDA que se mueven de sitios subsinápticos a la membrana sináptica, causando mayor hiperexcitabilidad y posiblemente explican la sensibilidad a bloqueadores de receptores NMDA que persiste durante el SE (López-Hernández *et al.*, 2005; Goiz *et al.*, 2008).

La liberación excesiva y persistente de glutamato inicia una cascada de eventos intracelulares mediados por calcio que llevan a la excitotoxicidad neuronal, en el hipocampo, amígdala, neocorteza y tálamo. La disfunción neuronal y muerte celular en estas áreas vulnerables del cerebro son consecuencia común después de la actividad convulsiva prolongada (Goiz *et al.*, 2008).

El EEG es el examen más importante para el diagnóstico de epilepsia en humanos y proporciona evidencia acerca de la naturaleza parcial o generalizada de la convulsión. El EEG constituye una prueba confirmatoria de epilepsia en perros (Goiz *et al.*, 2008). Se ha propuesto un sistema de registro encefalográfico de 12 electrodos que incorporan electrodos especiales para obtener trazos de la actividad eléctrica de la región temporal, no sólo de la neocorteza sino también de la paleocorteza (lóbulo piriforme y cuerpo amigdalino) y de la arquicorteza (hipocampo) (Pellegrino 2003; Goiz *et al.*, 2008). El EEG consiste en el registro y la evaluación de los potenciales eléctricos generados por el cerebro y obtenidos en la superficie del cráneo, el cual refleja la dinámica sináptica de la corteza cerebral. La misma está dada por PPSE y PPSI desarrollados en grandes dendritas y en los cuerpos neuronales de extensas poblaciones de células piramidales que se orientan en columnas más o menos perpendiculares a la superficie cortical. Si bien lo ideal sería obtener el trazado en las condiciones más naturales posibles, la falta de colaboración de los perros hace necesario algún tipo de restricción química. Por otra parte, los autores que han trabajado restringiendo a estos animales en forma mecánica, reconocen los problemas que ocasionan los artificios producidos por los movimientos, que pueden ser malinterpretados como grafoelementos patológicos (Pellegrino 2003).

Los fenómenos bioeléctricos cerebrales normales consisten en una actividad de base o de fondo, a la que se agrega eventualmente una actividad transitoria. La actividad base se caracteriza por la existencia de ritmos u ondas de forma y duración similares, con aparición regular recurrente. Tales ritmos se definen en base a su frecuencia y amplitud. La frecuencia es el número de ciclos u oscilaciones completas de una onda que tienen lugar en la unidad de tiempo; su unidad es en hertz (Hz) que equivale a un ciclo por segundo. La amplitud de estas ondas se refiere a la magnitud de los cambios de voltaje, medidos de pico negativo a pico positivo, y se expresan en microvoltios (μV) (Pellegrino 2003). Las ondas de aparición regular recurrente que conforman la actividad de base se dividen según su composición frecuencial en las siguientes bandas: Delta: 0.5-3.5 Hz (zona cortical, estímulos ambientales y orgánicos, frecuencia lenta y de gran amplitud, sueño profundo), Theta: 4-7.5 Hz (disminución del estado de conciencia), Alfa: 8-13.5 Hz (análoga a la actividad sincronizada de la corteza y el tálamo, pacientes despiertos, la actividad eléctrica cerebral incrementa en frecuencia y disminuye en amplitud), Beta₁: 14-21 Hz (corteza cerebral, condición de alerta, percibe estímulos sensoriales la frecuencia incrementa aún más). Beta₂: 22-30 Hz, Sigma: 7-14 Hz (actividad de aparición episódica como los husos de sueño) (Goiz 2007; Pellegrino 2003; Jasper 2002). La actividad anormal del EEG puede establecerse con dos conclusiones principales: 1) que el trazado refleja una perturbación permanente de la función cerebral de tipo focal, multifocal o generalizado, con alteraciones evidentes de la actividad de base y 2) que en una lesión cortical focal multifocal o generalizada, el registro se normaliza cuando pasa el período agudo, sin afectar la actividad base (Pellegrino, 2003).

Dentro de los primeros 30 minutos en SE el perro desarrolla hipertensión arterial, aumento en el flujo sanguíneo cerebral, hipoxemia, hipercabemia, hiperglucemia y acidosis láctica. Los cambios posteriores pueden incluir hipotensión arterial, disminución en el pH arterial, fiebre, hiperpotasemia, mioglobinuria, e hipoglucemia. La combinación de un colapso circulatorio la hipoperfusión de órganos, y el agotamiento de energía puede llevar a una insuficiencia severa, irreversible de los órganos (renal, hepático, cardíaco) (Podell 2009).

El tratamiento inicial para controlar el SE en perros es la administración i. v. del DZP que en esta especie tiene una vida media de 3.2 h a una dosis de 0.5-1.0 mg/kg, (dosis máxima 20 mg). La dosificación se puede repetir 2 horas después. También puede ser administrado por vía rectal a una dosis de 1 mg/kg alcanzando concentraciones en plasma a los 14 minutos aproximadamente. Los efectos secundarios de esta benzodiazepina son: depresión respiratoria, hipotensión y alteración de la conciencia (Platt 2009). A pesar de que dicho fármaco tiene capacidad de detener el SE, este debe ser administrado en dosis altas, generando efectos adversos que pueden poner en riesgo la integridad de los perros. Es por esta razón, que se siguen desarrollando nuevas terapias farmacológicas más eficaces y seguras. Con base en este planteamiento el presente trabajo propone el uso de la DDS.

Se sabe que la DDS (4,4'-diamino-difenilsulfona) tiene efecto anticonvulsivo y ha sido probado en modelos experimentales de kindling en ratas y en gatos siendo efectiva incluso días después de haber finalizado el tratamiento (Hamada *et al.*, 1991); también se ha reportado que la DDS es capaz de inhibir la actividad eléctrica convulsiva inducida por la administración del AK y puede controlar la propagación de la descarga neuronal del sitio epileptogénico a otras regiones del cerebro en ratas (Altagracia *et al.*, 1994; Ríos *et al.*, 1993). El mecanismo a través del cual actúa la DDS aún no se conoce. Sin embargo se ha propuesto que su capacidad como bloqueador de los receptores de glutamato y el incremento de la inhibición neuronal, posiblemente por neuronas GABAérgicas, así como al regular el flujo de calcio en las neuronas (Santamaria *et al.*, 1997).

En la actualidad se cuenta solamente con un estudio sobre la administración de la DDS para definir su farmacocinética y biodisponibilidad en perros, los resultados demuestran que la vida media del fármaco administrada por vía intravenosa es de 13.4 h y por vía oral fue de 11.5 h a una dosis de 5 mg/kg (Hekman *et al.*, 1989). A pesar de que se ha probado su eficacia en modelos experimentales de epilepsia, no se sabe si tiene efecto una vez instalado el SE. Asimismo se desconoce su interacción con el DZP, por lo que es importante realizar estudios encaminados a demostrar su eficacia en este padecimiento.

1.2 Planteamiento del problema

Debido a que en la actualidad no existe un tratamiento seguro y eficaz para detener el SE, y solo se cuenta con el DZP que al ser administrado en altas dosis, genera efectos adversos importantes que ponen en riesgo la integridad de los animales, y a pesar de estos riesgos, es el tratamiento de elección para detener el SE en perros, es necesario realizar un estudio de seguridad e interacción de fármacos para probar un nuevo tratamiento con mayor seguridad y posible efecto anti-convulsivo durante el SE de la DDS aplicado en modelos de ratas para complementar toda la información posible antes de ser aplicado en perros.

1.3 Hipótesis

Si la DDS administrada sola o en combinación con DZP tiene la capacidad para inhibir el SE en ratas, entonces observaremos una actividad eléctrica cerebral normal en los animales tratados al ser comparados con el grupo control no tratado.

1.4 Objetivos

Evaluar el posible efecto inhibitor del SE de la DDS administrada sola o en combinación con DZP por medio de VEEG en el modelo de SE inducido con AK en ratas.

Evaluar el posible efecto neuroprotector de la DDS administrada sola o en combinación con DZP por medio de un análisis histológico con tinción de violeta de cresilo del área CA3 del hipocampo para determinar la densidad neuronal.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Éste trabajo de investigación se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez (INNN) con la aprobación del Subcomité Institucional para el Cuidado y uso de Animales en Experimentación (SICUAE), ya que cumplió con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 sobre las Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio.

2.1 Animales

Se utilizaron 42 ratas Wistar macho con un peso de 250-300 g a los que se les implantaron electrodos estereotáxicamente en corteza parietal y frontal para registrar la actividad eléctrica cerebral por medio de VEEG (Altagracia *et al.*, 1994; Vermoesen *et al.*, 2010).

2.2 Implantación de electrodos

Se utilizó como anestesia pentobarbital sódico (Anestesal, laboratorios Pfizer®) a una dosis de 40 mg/kg i. p. para insertar los electrodos en el cráneo fijándolos con acrílico dental, 7 días antes del experimento. Durante este tiempo los animales se mantuvieron en jaulas individuales con comida y agua *ad libitum* (Altagracia *et al.*, 1994; Vermoesen *et al.*, 2010) en el bioterio del INNN.

2.3 Tratamientos farmacológicos

Los animales fueron divididos de manera aleatoria en cuatro grupos citados a continuación: Grupo 1 (grupo control) administración de AK+Veh (solución NaCl 0.9%) i. p. (n=12); Grupo 2 se les administró AK+DDS25 (SIGMA® laboratories) i. p. (Hamada *et al.*, 1991) (n=10); Grupo 3 se le administró AK+DZP20 (Valium®, laboratorios Roche) i. p. (Vermoesen *et al.*, 2010) (n=10); Grupo 4 se le administró AK+DDS25/DZP20 i. p. (n=10).

2.4 Análisis del VEEG

Se inició el estudio colocando a las ratas en cajas de acrílico individuales para tomar lectura del VEEG (EBNeuro B.E light, Software database Galileo NT PMS). Después de 10 min de lectura basal se les inyectó AK (SIGMA® laboratories) recién disuelto en solución salina (NaCl 0.9% Pisa® Farmacéutica Mexicana S.A. de C.V.) a una dosis de 12 mg/kg i. p. para inducir el modelo de SE de acuerdo con lo reportado (Pitkänen *et al.*, 2006; Kondratyev 2002; Peterson y Albertson 1998). Los animales recibieron el tratamiento 90 minutos después de la administración i. p. del AK (Vermoesen *et al.*, 2010; Kondratyev *et al.*, 2002; Seegers *et al.*, 2002) y se hizo lectura del VEEG durante los 150 min posteriores para determinar la eficacia de los tratamientos (Choy *et al.*, 2010). Veinticuatro horas después de la administración de AK se tomó lectura del VEEG por 30 min (Kondratyev *et al.*, 2002; Vermoesen *et al.*, 2010).

Para identificar la AEC en el VEEG se tomó en cuenta lo reportado por Kanamori y Ross (2011), ellos indican que las convulsiones en el VEEG se identifican como un periodo de cambios consistentes y repetitivos en amplitud y frecuencia de la actividad eléctrica que es claramente diferente a la actividad interictal que persiste por >10 s Pitkänen *et al.*, (2005) comenta que la descarga debe durar al menos 5 s y la amplitud debe ser por lo menos dos veces más alta que VEEG basal.

2.5 Análisis conductual

Para la observación de las diferentes conductas se utilizó la escala de Racine (1972) la cual se divide en 5 fases. Fase I: *Clonus* faciales, Fase II: Sacudidas de cuerpo (sacudidas de perro mojado), Fase III: Mioclonías de miembros torácicos, Fase IV: Levantamiento de miembros torácicos (posición de canguro) y Fase V: Levantamiento y caída de la rata.

2.6 Histología

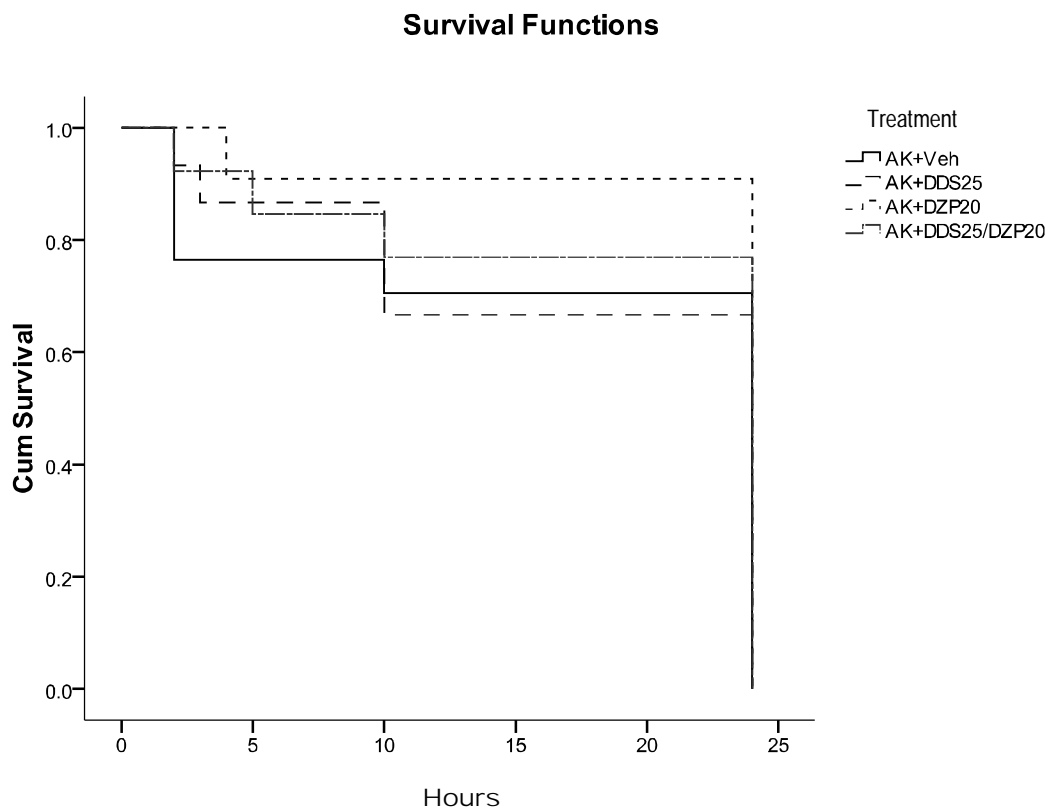
Una vez terminado el estudio de VEEG se les administró una sobredosis de pentobarbital sódico (300mg/kg) como eutanasia, para posteriormente perfundirlas utilizando una solución Hartman (Pisa® Farmacéutica Mexicana S.A. de C.V) de 500 ml con 1ml de heparina seguida de formalina 1 lt (32.4g de cloruro de sodio, 3600ml de agua desionizada, 400 ml formol necesario para 3 animales), para fijar el tejido cerebral. Se extrajo el cerebro y se conservó en formalina. Posteriormente se colocó en una matriz sagital de cerebro de roedor y se diseccionó en el sitio localizado entre 3.14 y 4.16 mm posterior a Bregma (Blondeau, *et al.*, 2002) antes de ser incorporado en cera de parafina (Cock, *et al.*, 2002). Después se cortaron secciones de 12 µm con el microtomo (Leica® RM2125RT), y se recolectaron 10 secciones (escogidas al azar) por rata, 6 ratas de cada grupo y 3 ratas Sham, para teñir el tejido con violeta de cresilo y realizar el conteo neuronal en 1 mm lineal en el área CA3 del hipocampo usando un microscopio óptico (Leica® DME) con una ampliación de 400X. Las neuronas con cuerpos celulares encogidos o a las que rodeaban espacios vacíos fueron excluidas (Blondeau, *et al.*, 2002).

La severidad del daño neuronal también fue semi-cuantificada por la escala de Brandt *et al.*, (2007) como sigue: 0= no hay daño obvio; 1= apariencia normal de la estructura sin evidencia clara de pérdida neuronal visible; 2= lesiones que involucran 20-50% neuronas; 3= lesiones que involucran >50% de neuronas. Es necesaria una pérdida del 15-20% de neuronas para que pueda ser detectado por inspección visual con una ampliación de 200X (Brandt *et al.*, 2007; Brandt *et al.*, 2006; Pitkänen *et al.*, 2005).

3. RESULTADOS

3.1 Supervivencia

Para medir la supervivencia de los diferentes tratamientos en estudio se realizó la prueba estadística de Kaplan Meier en la cual no se observaron diferencias significativas entre los grupos 1, 2, 3 y 4 (Gráfica 1). Los porcentajes de mortalidad fueron los siguientes: el grupo control (AK+Veh) obtuvo un 36.84% seguido del grupo tratado con DDS25 con 33.33% después el grupo tratado con la combinación de la DDS25/DZP20 con 16.66% y por último el grupo tratado con DZP20 a una dosis de 20 mg/kg con solo 9.09%.



Gráfica 1. Probabilidad estimada de supervivencia después de los tratamientos. Los animales fueron monitoreados durante 24 h después de la administración AK y el tiempo en el que cada uno de los animales falleció fue registrado. Se realizó la prueba de Kaplan Meier seguida de la prueba de Log Rank y no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

3.2 Actividad eléctrica convulsiva (AEC)

El tiempo de convulsión eléctrica se calculó como el porcentaje del tiempo total de grabación en que el animal presentó AEC (Altagracia *et al.*, 1994). En la figura 1 se muestran las imágenes representativas de la AEC post-tratamiento de los diferentes grupos en estudio. Los resultados del porcentaje de AEC observados durante 2.5 h post-tratamiento se muestran en el cuadro 1, los valores se expresan como promedios de los 10 a 12 animales por grupo. En este estudio se observó que la AEC fue del 100% en los animales control a los que solo se les administró solución salina en el lapso de 2.5 h que duró el estudio de VEEG post-tratamiento. En los animales tratados con DDS25 se observó un 96.6% de AEC, que representan una disminución del 3.4%. Los animales tratados con DZP20 presentaron 11.9% de AEC, que representa una disminución del 88.1%. Finalmente en la terapia combinada de DDS25/DZP20 se observó una AEC de 12% que representa una disminución del 88% en comparación con el grupo control. Con estos resultados se puede observar que todos los tratamientos que se probaron en este estudio tuvieron la capacidad de disminuir la AEC en comparación con el grupo control. Todos los datos fueron analizados con la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis ($p=0.000$) seguida de la prueba de Mann Whitney ($p<0.05$). Asimismo, los resultados del porcentaje de AEC observados durante 30 min 24 h después de la administrar del AK se muestran en el cuadro 1 y están expresados como valores promedios de las evaluaciones de 10 a 12 animales por grupo. En este estudio se observó una AEC del 42.2% en los animales control durante 30 min de VEEG a las 24 h de administrar el AK, los animales tratados con DDS25 mostraron un 10.7% de AEC, que representa una disminución del 77.33% en comparación con el grupo control. El grupo tratado con DZP20 mostró una AEC de 13.3%, que representa una disminución del 71.82% y finalmente el grupo al que se le administró la combinación de DDS25/DZP20 mostraron solo un 4.7% de AEC que representa una disminución del 90.04% en comparación con el grupo control. Los datos fueron analizados con la prueba de Kruskal Wallis ($p=0.04$) seguida de la prueba de Mann Whitney ($p=0.04$).

A



B

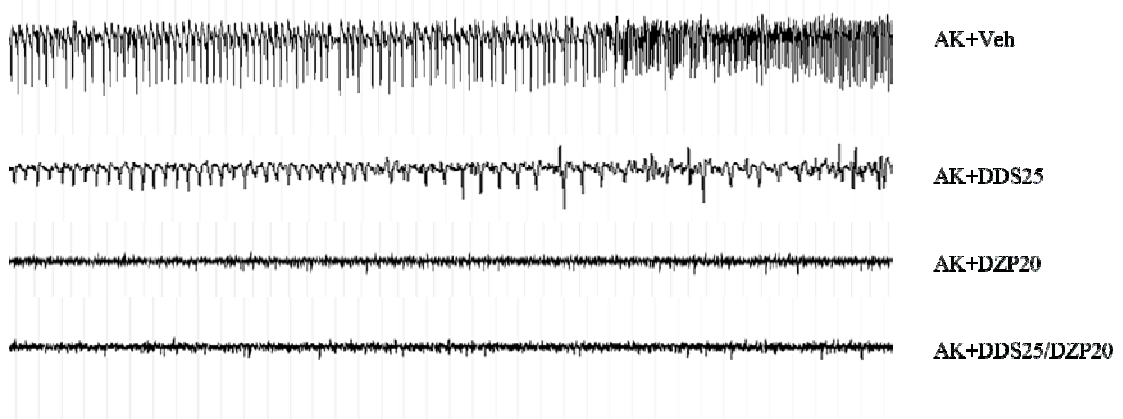


Figura 1. AEC post-tratamiento. *A:* Imagen representativa de la AEC post-tratamiento de los diferentes grupos en estudio. *B:* Diferentes tratamientos en el VEEG. El EEG tiene una sensibilidad de 200 μ V/mm.

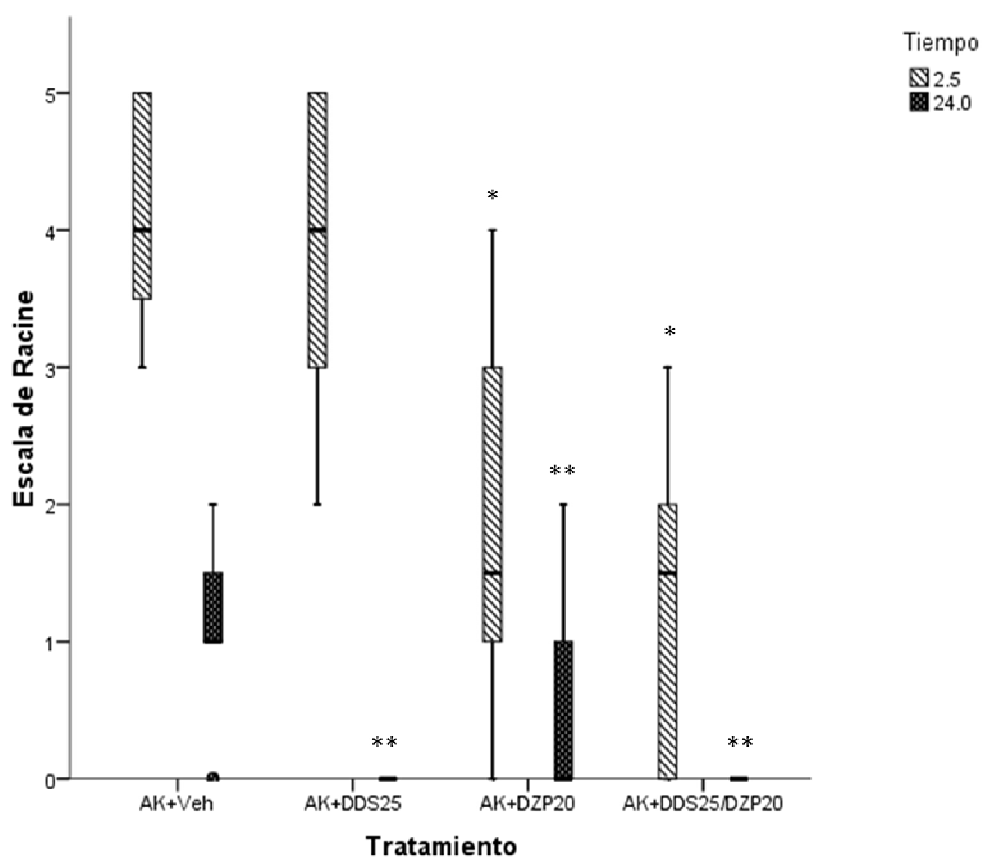
Cuadro 1. Efecto de los tratamientos en la AEC del VEEG.

Tratamiento Farmacológico	AEC Post-tratamiento (2.5 h)	% de reducción (Post-tx)	AEC 24 h después (30 min)	% de reducción (24 h)	Número de ratas
Control (AK+Veh)	100%		47.2%		12
DDS (AK+DDS25)	96.6% *	3.4%	10.7%	77.33%	10
DZP (AK+DZP20)	11.9% *	88.1%	13.3%	71.82%	10
DDS/DZP (AK+DDS25/DZP20)	12% *	88%	4.7% **	90.04%	10

Los resultados se expresan en porcentajes de la AEC observada en el VEEG durante 2.5h post-tratamiento y 24 h después de administrar el AK durante 30 min. El porcentaje de reducción con respecto al control (% de reducción) es la disminución de la AEC de los grupos con tratamiento en comparación con el grupo control. Se encontraron diferencias significativas de la AEC durante el estudio post-tratamiento (Post-tx) entre el grupo control y los grupos con tratamiento * $p=0.00$ Kruskal Wallis, * $p<0.05$. La AEC 24 h después de la administración del AK durante el estudio de 30 min mostró diferencias significativas entre el grupo control y la combinación de DDS25/DZP20 Kruskal Wallis ** $p=0.04$ Mann Whitney ** $p=0.04$.

3.3 Alteraciones conductuales evaluados con la escala de Racine

Los resultados correspondientes a la conducta valorada por la escala de Racine (1972) post-tratamiento durante 2.5h y 24h después de administrar el AK durante 30 min de estudio se muestran en la gráfica 2. Los valores están expresados en medias \pm error estándar (E.E.) de los 10 a 12 animales por grupo. En este estudio se observó que los animales control (AK+Veh) desarrollaron una media de 4.08 ± 0.22 conductual que corresponde a el levantamiento de miembros anteriores (posición de canguro) por efecto del AK durante las 2.5 h de estudio. Mientras que los animales tratados con DDS25 obtuvieron una media de 3.8 ± 0.32 conductual que corresponde también a el levantamiento de miembros posteriores (posición de canguro) y representan una reducción del 6.86% en comparación con el grupo control. Los animales tratados con DZP20 obtuvieron una media de 1.7 ± 0.42 conductual que corresponde a las SPM constituye una reducción del 58.33% y finalmente la terapia combinada de DDS25/DZP20 obtuvieron una media de 1.3 ± 0.39 conductual que corresponde a mioclonias faciales según la escala de Racine y representa una reducción del 68.13% en comparación con el grupo control. Estos resultados demuestran que la combinación de DDS25/DZP20 es la más eficiente para controlar las alteraciones conductuales inducidas por AK en comparación con el grupo control (ANOVA, seguida de Tukey; n=10-12 experimentos independientes). Las conductas observadas a las 24 h de administrar el AK durante 30 min se muestran en la gráfica 2. Los valores están expresados como medias de los 10 a 12 animales por grupo. El grupo control mostró una media de 1.17 conductual que corresponde a las SPM en la escala conductual. Los animales tratados con DDS25 no presentaron ninguna alteración de la conducta. El grupo tratado con DZP20 obtuvieron una media de 0.5 conductual que corresponde al punto intermedio entre ninguna alteración de la conducta y las mioclonias faciales. Finalmente el grupo tratado con la combinación de DDS25/DZP20 no presentaron ninguna alteración de la conducta. Los datos fueron analizados por la prueba de Kruskal Wallis (P=0.00) seguido de la prueba de Mann Whitney (P<0.03). Los resultados obtenidos demuestran que la DDS25 inhibe la respuesta conductual inducida por el AK de acuerdo a la escala de Racine.



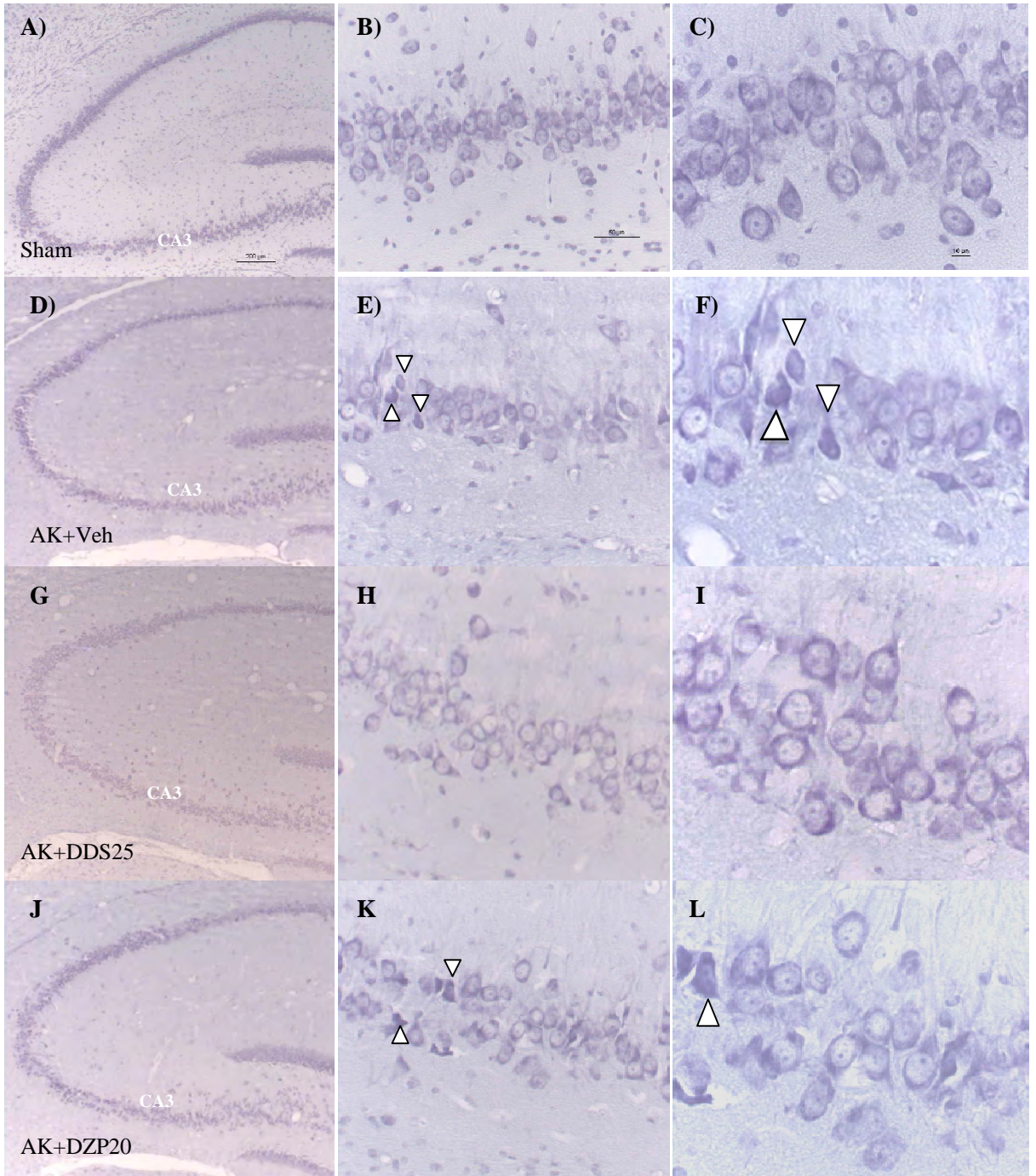
Gráfica 2. Alteraciones conductuales evaluados con la escala de Racine durante 2.5 h post-tratamiento y 24 h después de administrar AK. Resultados se expresan en medias \pm el error estándar. Las conductas observadas post-tratamiento durante el estudio de 2.5h mostraron diferencias significativas entre grupos con la prueba de ANOVA (* $p=0.00$) seguida de Tukey (* $p=0.00$) mostrando diferencias significativas en los grupos tratados con DZP20 y DDS25/DZP20 comparados con el grupo AK+Veh. Las conductas observadas 24 horas después de la administración del AK durante 30 min mostraron diferencias significativas entre grupos con la prueba de Kruskal Wallis (** $p=0.00$) y seguida de Mann Whitney mostrando diferencias significativas (** $p<0.03$) entre el grupo AK+Veh ($n=12$) y los grupos con tratamiento anticonvulsivo ($n=10$).

3.4 Efecto neuroprotector de la DDS administrada sola o en combinación con el DZP evaluado con base en la cantidad de células piramidales del CA3 del hipocampo viables.

La gráfica 3 presenta los resultados del conteo de neuronas piramidales en 1 mm lineal del área CA3 del hipocampo, teñidas con violeta de cresilo en los hemisferios cerebrales. Los valores están presentados en medias \pm E.E. de los 3 a 9 animales en estudio. El grupo Sham (control) obtuvo una media de 212.77 ± 1.49 neuronas piramidales, el grupo al que se le administró solución salina obtuvo una media de 124.33 ± 17.72 neuronas piramidales hipocampales que equivale a una disminución del 41.56% en comparación con el grupo control. El grupo tratado con DDS25 obtuvo una media de 165.11 ± 17.93 neuronas piramidales que equivale a una disminución del 22.39%. El grupo tratado con DZP20 obtuvo una media de 157.72 ± 31.12 neuronas piramidales que equivale a una disminución del 25.87%. Finalmente el grupo tratado con la combinación de DDS25/DZP20 una media de 195.77 ± 10.24 neuronas piramidales que equivale a una disminución del 7.98% en comparación con el grupo control. Como se puede apreciar el grupo tratado con la combinación de DDS25/DZP20 obtuvo los mejores resultados en cuanto a neuroprotección. Se realizó ANOVA ($p < 0.05$) seguida de Dunnett ($p = 0.04$).

Se realizó un análisis semi-cuantitativo para observar la severidad del daño neuronal (ver gráfica 4) utilizando un sistema de clasificación realizado por Brandt *et al.* (2007). Los resultados se expresan en medias de las 2 secciones del hipocampo observando la severidad del daño neuronal del área CA3 con un foco de 200X (ver figura 2). El grupo Sham (control) obtuvo calificación de cero ya que no se observó daño obvio. El grupo AK+Veh obtuvo una media de 2.3 de calificación que corresponde a lesiones que envuelven del 20-50% de las neuronas del área CA3. El grupo tratado con DDS25 obtuvo una media de 1.9 de calificación que corresponde al mismo daño neuronal observado en el grupo sin tratamiento anticonvulsivo. El grupo tratado con DZP20 obtuvo una media de 1.8 de calificación que corresponde a las mismas observaciones que el grupo AK+Veh y el grupo tratado con DDS25. Mientras que el grupo tratado con la combinación de

DDS25/DZP20 obtuvo una media de 0.5 de calificación que corresponde entre una apariencia sin daño obvio, a una apariencia anormal sin evidencia clara de pérdida neuronal visible. Se realizó la prueba de Kruskal Wallis ($p=0.00$) mostrando diferencias significativas entre grupos seguido de la prueba de Mann Whitney ($p=0.00$) encontrando diferencias significativas entre el grupo AK+Veh y el grupo tratado con la combinación de DDS25/DZP20. Nuevamente la combinación de la DDS25/DZP20 obtuvo el menor daño neuronal comportándose de igual manera que el grupo Sham en comparación con los otros grupos en estudio.



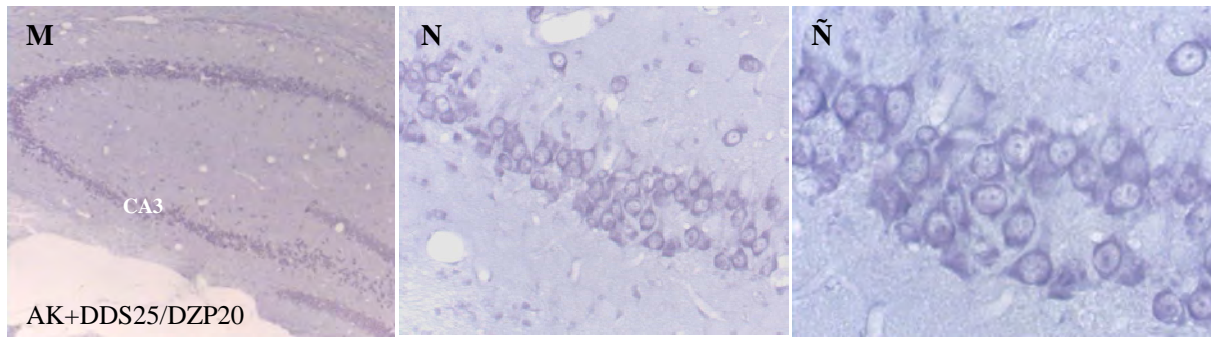
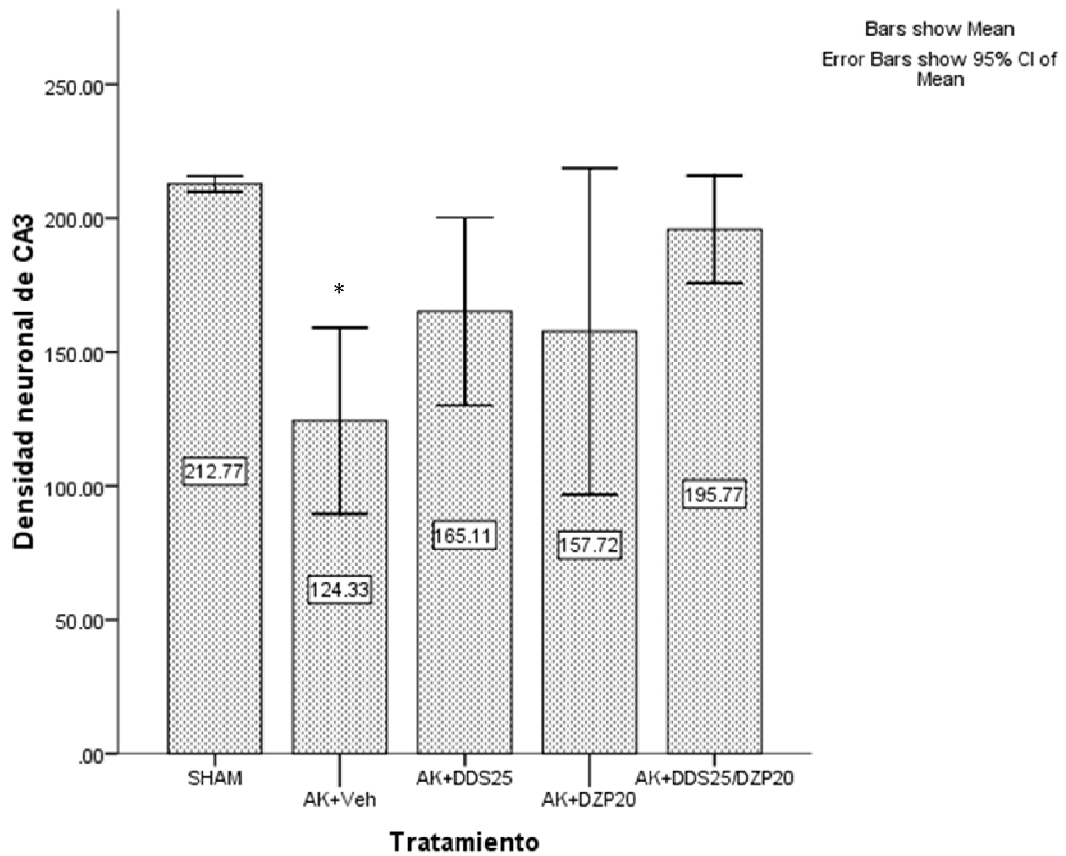
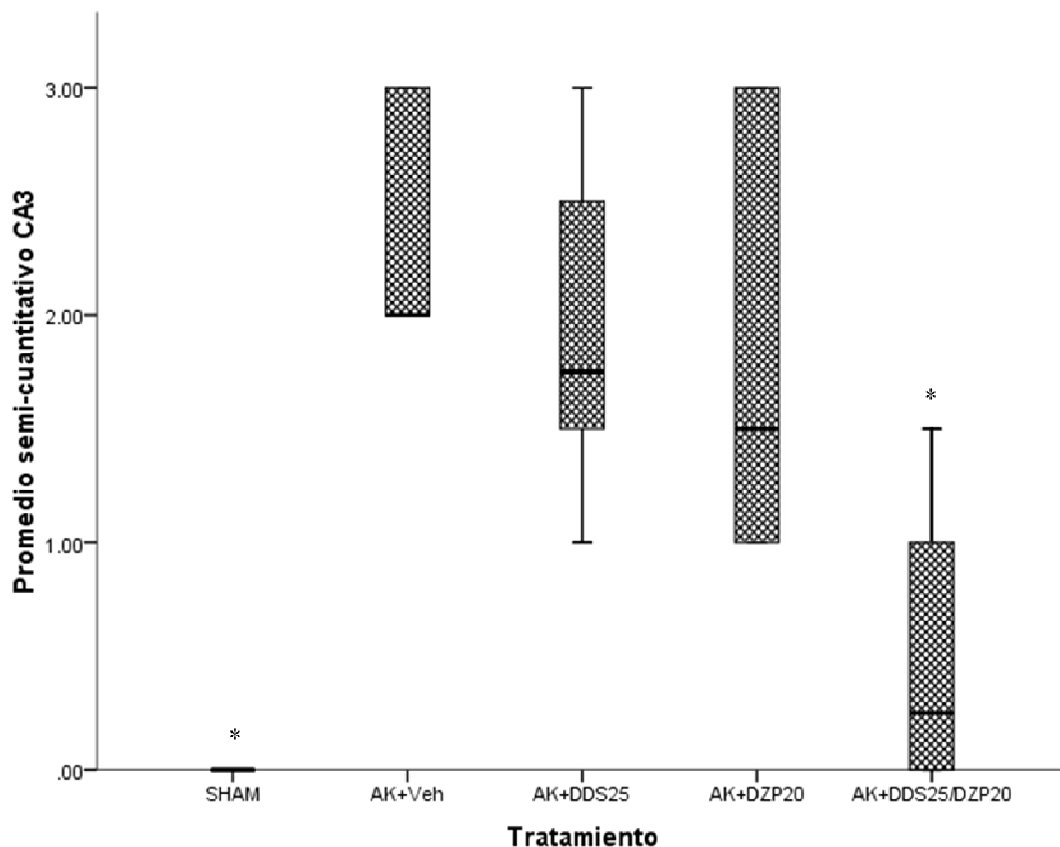


Figura 2. Imágenes representativas del área CA3 del hipocampo. Imágenes en las que se muestran las células piramidales de la capa CA3 del hipocampo, 24 h después de la administración de AK a una dosis de 12 mg/kg. Panel A: Ratas Sham ampliación 40X., Panel B y C) ampliación 200X y 400X respectivamente. Panel D) ratas con AK+Veh ampliación 40X, Panel E y F) ampliación 200X y 400X respectivamente. Panel G) ratas con AK y tratadas con DDS25. Panel H) 200X, Panel I) ampliación 400X. Panel J, K y L) ratas con AK y tratadas con DZP25 ampliación de 40X, 200X y 400X respectivamente. Panel M, N y Ñ) ratas con AK y tratadas con la combinación de DDS25/DZP20 con ampliación de 40X, 200X y 400X respectivamente. Técnica histológica con violeta de cresilo. Las flechas blancas señalan las neuronas picnóticas.



Gráfica 3. Densidad neuronal del área CA3 del hipocampo. La gráfica muestra las medias \pm E.E. de la densidad neuronal total evaluada en las 2 secciones de hipocampo del área CA3, en los diferentes grupos experimentales a 400X. Sham (n=3), AK+Veh (n=9), AK+DDS25 (n=6), AK+DZP20 (n=6), y AK+DDS25/DZP20 (n=6). Se encontraron diferencias significativas entre el grupo AK+Veh y los demás grupos en estudio. ANOVA seguida de la prueba de Dunnett (*p=0.04).



Gráfica 4. Severidad del daño neuronal evaluado con la escala semi-cuantitativa de Brandt. Los resultados están expresados en medias \pm E.E. El grupo Sham (control) (n=3) obtuvo cero ya que no se observó daño obvio de acuerdo con la escala de Brandt. Al grupo AK+Veh (2.3 de calificación) (n=9); El grupo DDS25 (1.9 de calificación) (n=6) y el grupo tratado con DZP20 (1.8 de calificación) (n=6) les corresponden las lesiones que envuelven del 20-50% de las neuronas del área CA3. El grupo DDS25/DZP20 (0.5 de calificación) (n=6) le corresponde entre una apariencia sin daño obvio a una apariencia anormal sin evidencia clara de pérdida neuronal visible. Kruskal Wallis (*p=0.00) seguido de Mann Whitney (*p=0.00) encontrando diferencias significativas entre el grupo AK+Veh y el grupo DDS25/DZP20.

4. DISCUSIÓN

En la presente investigación se evaluó la eficacia de la DDS sola o en combinación con el DZP para inhibir el SE inducido por la administración de AK. El AK es un agonista de los receptores de glutamato tipo kainato (familia de los receptores ionotrópicos), tras su unión al receptor el AK induce una serie de eventos celulares (1) entrada de calcio y sodio a la célula (2) producción de especies reactivas del oxígeno (3) disfunción mitocondrial que conduce a la apoptosis y necrosis neuronal (Contractor *et al.*, 2011; Xiang-Yu *et al.*, 2011).

La supervivencia observada en este estudio no fue significativamente diferente entre los grupos con tratamiento anticonvulsivo y el grupo control, lo que sugiere que la supervivencia está sujeta al modelo de SE, y no al tratamiento administrado. La mortalidad obtenida en el grupo tratado con DZP a una dosis de 20 mg/kg fue de 9.09% este resultado difiere de con la mortalidad reportada por Hasson *et al.* (2008) y Vermoesen *et al.*, (2010) que fue del cero por ciento.

En cuanto al mecanismo exacto por el cual la DDS es capaz de atenuar la excitotoxicidad, se ha planteado que tal como la zonisamida inactiva los canales de calcio voltaje dependientes, lo que podría deberse a su similitud estructural (Suzuki *et al.*, 1992). Entonces la DDS inhibe los efectos excitotóxicos tanto en la liberación excesiva del glutamato, como en la sobreproducción de radicales libres derivados de procesos inflamatorios. Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que todos los grupos a los que se les administró tratamiento anticonvulsivo inhibieron la AEC en comparación al grupo control y se observó que la DDS25 es capaz de inhibir la AEC post-tratamiento durante 2.5 h de forma parcial (3.4%) en comparación con los grupos tratados con DZP20 (88.1%) y la combinación de DDS25/DZP20 (88%) estos dos últimos resultados se observa el efecto del DZP20 sobre la AEC. El DZP es una benzodiazepina agonista de los receptores GABA_A, es de rápida acción (sólo unos minutos) y efectivo en la terapia inmediata para detener el SE en ratas (Hasson *et al.*, 2008). Recientemente Hasson *et al.* (2008) comprobó que la terapia con DZP a 20 mg/kg administrado 45 min después de

que se presenta el SE es inefectiva. Las altas concentraciones de DZP pueden causar una excesiva activación de los receptores GABA_A esto puede provocar una desensibilización de los mismos receptores causando despolarización y daño neuronal (Ricci *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en este estudio sobre la AEC reproducen los obtenidos por Altagracia *et al.*, (1994) con la administración de la DDS sola a una dosis de 9.735 y 12.5 mg/kg 30 min antes de administrar el AK (una dosis de 10 mg/kg), obteniendo una disminución del 52 % y 80% en la AEC inducida por AK. Lo que demuestra el efecto dosis dependiente de la DDS. La DDS por sí sola no pudo inhibir la AEC administrándola después del daño causado por el SE a una dosis de 25 mg/kg utilizada en este estudio, ya que solo presentó una disminución del 3.4% de la AEC en comparación con el grupo control, se tendría que probar una dosis más alta para ver si la DDS es capaz de inhibir la AEC en el SE como inhibe la AEC en el modelo de epilepsia inducida por AK (Altagracia *et al.*, 1994). La AEC observada en este estudio 24 horas después de la administración del AK solo tuvo efecto terapéutico la combinación de DDS25/DZP20 con una disminución del 99.57% en comparación con el grupo control. Este es un dato interesante ya que la DDS25 y el DZP20 por separado no fueron capaces de inhibir la AEC a las 24 h durante 30 min ya que solo la redujeron en un 22.66% y 28.17% respectivamente en comparación con el grupo control.

En cuanto a los resultados obtenidos de las alteraciones conductuales post-tratamiento durante 2.5 h, se observa el efecto inhibitorio del DZP20 solo y en combinación con la DDS25 sobre las mismas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Vermoesen *et al.*, (2010) el cual señala que la administración de DZP a una dosis de 10 mg/kg es suficiente para terminar con el SE a nivel de comportamiento pero no a nivel electroencefalográfico en el modelo de pilocarpina (modelo animal de epilepsia de lóbulo temporal). Las alteraciones conductuales a las 24 h de administrar el AK durante 30 min fueron diferentes entre el grupo AK+Veh y los grupos con tratamiento, destacándose los grupos tratados con DDS25 solo y en combinación DDS25/DZP20 ya que ninguna rata presentó alteraciones conductuales, en cambio algunos animales tratados con DZP20 presentaron mioclonias faciales, lo que concuerda con lo descrito por Vermoesen *et al.*, (2010) ya que observó mioclonias faciales y movimientos límbicos aislados en las ratas

tratadas con DZP a una dosis de 20 mg/kg monitoreadas 24 h después de administrar el AK.

El mecanismo de acción de la DDS aún no se conoce. Sin embargo varios estudios han sugerido que la DDS tiene efectos antioxidantes a través de la inhibición directa e irreversible de la mieloperoxidasa (Ríos *et al.*, 2004) y la hidrogeno peroxidasa actuando como atrapador de especies reactivas del oxígeno (Rodríguez *et al.*, 1999). También se ha documentado que la DDS bloquea la peroxidación lipídica. Este efecto probablemente refleja una disminución de la muerte celular mediada por radicales libres (Díaz-Ruiz *et al.*, 2011). Las acciones antiinflamatorias de la DDS son: (1) interferencia con la migración quimiotáctica de neutrófilos (2) supresión del reclutamiento de neutrófilos (3) inhibición de la actividad de peroxidasa eosinófila (4) inhibición de los productos generados por la 5-lipoxygenasa. Todas estas acciones de la DDS parecen proteger a las células del daño mediado por neutrófilos y eosinófilos relacionada con la inhibición directa de la generación de radicales libres derivados del oxígeno neurotóxicos. En este estudio se observó una neuroprotección significativa de todos los tratamientos en comparación con el grupo sin tratamiento anticonvulsivo, destacándose la neuroprotección obtenida por la combinación de la DDS25/DZP20 que fue del 92.02% en comparación con el grupo sin tratamiento, obteniendo los mismos resultados que los reportados por Ríos *et al.* (2004) con la administración de la DDS a una dosis de 9.375 y 12.5 mg/kg que fue del 93 y 92% respectivamente, en comparación con el grupo control. Los resultados obtenidos con la escala semi-cuantitativa de Brandt para ver el daño neuronal indican que el único tratamiento neuroprotector fue la combinación de DDS25/DZP20 en comparación con los demás tratamientos en estudio.

5. CONCLUSION

La DDS administrada sola a una dosis de 25mg/kg no fue capaz de inhibir la AEC post-tratamiento durante 2.5 h ni a las 24 h de la administración de AK. Los grupos tratados con DDS25 sola o en combinación DDS25/DZP20 a las 24 h de administrar el AK no mostraron alteración conductual. La combinación de DDS25/DZP20 mostró ser el mejor fármaco neuroprotector y tratamiento inhibitorio para detener el SE como para inhibir las alteraciones conductuales post-tratamiento y 24 h después de administrar AK. Se necesitan más estudios para comprobar la eficiencia de la DDS sola con una dosis mayor ya que en estudios anteriores han observado que es un fármaco con una acción dosis respuesta. La combinación de DDS y DZP destacó positivamente en todas la pruebas realizadas, con lo que se propone su uso como tratamiento inhibitorio del SE en perros.

SIGLAS

AEC= actividad eléctrica convulsiva.

AK= ácido kaínico.

AK+Veh= ácido kaínico a una dosis de 15mg/kg y la administración de solución salina.

AK+DDS25= ácido kaínico a una dosis de 15 mg/kg y la administración de dapsona a una dosis de 25 mg/kg.

AK+DDS25/DZP20= ácido kaínico a una dosis de 15 mg/kg y la administración de dapsona a una dosis de 25 mg/kg en combinación con diazepam a una dosis de 20 mg/kg.

AK+DZP20= ácido kaínico a una dosis de 15 mg/kg y la administración de diazepam a una dosis de 20 mg/kg.

DDS= dapsona.

DDS25=dapsona a una dosis de 25 mg/kg.

DDS25/DZP20= dapsona a una dosis de 25 mg/kg en combinación con diazepam a una dosis de 20 mg/kg.

DZP= diazepam.

DZP20= diazepam a una dosis de 20 mg/kg.

EEG= electroencefalograma.

VEEG= video-electroencefalograma.

PPSE= potenciales postsinápticos excitatorios.

PPSI= potenciales postsinápticos inhibitorios.

SE= *status epilepticus*

SPM= sacudidas de perro mojado.

6. REFERENCIAS

1. López-Hernández E, Bravo J y H Solís. “Epilepsia y antiepilépticos de primera y segunda generación. Aspectos básicos útiles en la práctica clínica”. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 2005;48(5):201-209.
2. Goiz G, S Caballero, Solís H y H Sumano. “Epilepsia en perros”. *Veterinaria México*, 2008; 39(003):279-321
3. Berendt M. “Epilepsy”. *International Veterinary information Service* www.ivis.org 2004; Document No. B0230.0704.
4. Chandler K. “Canine Epilepsy; what can we learn from human seizures disorders?”. *The Veterinary Journal* 2006; 172:207-217.
5. Bollinger K and K Kline. “An Overview of Canine Idiopathic Epilepsy for the Small Animal Practitioner”. *Iowa State University Veterinarian*, 2000; Vol. 62 n°1.
6. Patterson E. “Canine idiopathic epilepsy: pathogenesis and clinical characteristics”. *DVM in focus*, 2004; November.
7. Berendt M, Gredal H, Ersbol AK and J Alving. “Premature death, risk factors, and life patterns in dogs with epilepsy”. *J Vet Intern Med* 2007; 21(4):671-672.
8. Podell M and W Fenner. “Bromide therapy in refractory canine idiopathic epilepsy”. *J Vet Intern Med* 1993; 7(5):318-327.
9. Dewey C. “Anticonvulsant Therapy in dog and cats”. *The Veterinary Clinics of North America in Small Animal Practice* 2006;36:1107-1127.
10. Podell M. “Antiepileptic drug therapy”. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 1998; 13:185-192
11. Saito M, Muñana K, Sharp N and N Olby. “Risk factors for development of *status epilepticus* in dogs with idiopathic epilepsy and effects of *status epilepticus* on outcome and survival time: 32 cases (1990-1996)”. *J Am Vet Med Assoc.* 2001; 219(5):618-23.
12. March P. “Seizures: classification, etiologies, and pathophysiology. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 1998; 13:119-131.
13. Chen J, Naylor D and C Wasterlain. “Advances in pathophysiology of *status epilepticus*”. *Acta Neurologica Scandinavica* 2007; 115(Suppl. 186):7-15.
14. Pellegrino F. “Electroencefalografía clínica en pequeños animales”. En: Pellegrino F, Suraniti A, Garibaldi L. editores. *El Libro de Neurología para la Práctica Clínica*. Argentina:Intermedica 2003:571-600.
15. Goiz, A. “Efecto de un tratamiento de acupuntura en el registro electroencefálico y en la presentación de convulsiones en perros con epilepsia idiopática”. *Tesis Maestría en Ciencias UNAM-México DF* 2007.
16. Jasper R. “Clinical Neurophysiology”. 2nd edition. *Oxford University Press*. New York, USA 2002.
17. Podell M. “How I treat status epilepticus”. *Proceedings of the Southern European Veterinary Conference & Congreso Nacional AVEPA* 2009; Barcelona, Spain.
18. Platt S. “Status Epilepticus”. *81st Western Veterinary Conference*. 2009;V198

19. Hamada K, Hiyoshi T, Kobayashi S, Ishida S, Yagi K and M Seino “Anticonvulsive effect of dapsone on amygdale-kindled seizures in rats and cats”. *Epilepsy Research* 1991; 10(2-3): 93-102.
20. Altagracia M, Monroy-Noyola A, Osorio-Rico L, Kravzov J, Alvarado-Calvillo R, Manjarrez-Marmolejo J y C Rios. “Dapsone attenuates kainic acid-induced seizures in rats”. *Neuroscience Letters* 1994; 176:52-54.
21. Rios C, Altagracia M, Monroy-Noyola A, Alvarado-Calvillo R, Manjarrez-Marmolejo J y L Osorio-Rico. “EEG evaluation of the anticonvulsive effect of dapsone in the kainic acid model of epilepsy”. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 1993; 36:259-261.
22. Santamaria A, Ordaz J, Rubio M, Solis F and C Ríos. “Neuroprotective Effect of Dapsone against Quinolinate-and Kainate-Induced Striatal Neurotoxicities in Rats”. *Pharmacology & Toxicology* 1997; 81:271-275.
23. Hekman P, Rens P, Rietvel E and A Coert. “Pharmacokinetics and bioavailability of dapsone in the beagle dogs”. *J of Small Animal Practice* 1989; 30:92-95.
24. Vermoesen, K. Smolders, I. Massie A. Mychotte, Y and R. Clinckers. “The control of kainic acid-induced status epilepticus”. *Epilepsy Research* 2010; 90:164-166.
25. Pitkänen A, Schwartzkroin PA and SL Moshé. “Models of Seizures and Epilepsy”. *Elsevier Academic press* 2006; USA.
26. Kondratyev A, Selby D and K Gale. “Status epilepticus leads to the degradation of the endogenous inhibitor of caspase-activated DNase in rats”. *Neuroscience Letters* 2002; 319:145-148.
27. Peterson S and T Albertson. “Neuropharmacology methods in epilepsy research”, Chapter 5, Experimental models of Status Epilepticus. *CRSpress.* 1998; United States of America.
28. Seegers U, Potschka H and W Loscher. “Transient increase of P-glycoprotein expression in endothelium and parenchyma of limbic brain regions in the kainite model of temporal lobe epilepsy”. *Epilepsy Research* 2002; 51:257-268.
29. Choy M, Wells JA, Thomas DL, Gadian DG, Scott RC and MF Lythgoe. “Cerebral blood flow changes during pilocarpine-induced status epilepticus activity in the rat hippocampus”. *Experimental Neurology* 2010; 225:196-201.
30. Kanamori K and B Ross. “Chronic electrographic seizure reduces glutamine and elevates glutamate in the extracellular fluid of rat brain”. *Brain Research* 2011; 1371:180-191.
31. Pitkänen A, Kharatishvilia I, Narkilahti S, Lukasiuk K and J Nissinen. “Administration of diazepam during status epilepticus reduces development and severity of epilepsy in rat”. *Epilepsy Research* 2005; 63:27-42.
32. Racine R J. "Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure". *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 1972; 32(3):281-94.
33. Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M and C Heurteaux. “Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance”. *Neuroscience* 2002; 109(2):231-241.
34. Cock H, Tong X, Hargreaves I, Heales S, Clark J, Patsalos P, Thom M and M Groves. “Mitochondrial dysfunction associated with neuronal death following status epilepticus in rat”. *Epilepsy Research* 2002; 48:157-168.

35. Brandt C, Glien M, Gastens A, Fedrowitz M, Bethmann K, Volk H, Potschka H and W Löscher. "Prophylactic treatment with levetiracetam after status epilepticus: Lack of effect on epileptogenesis, neuronal damage, and behavioral alterations in rats". *Neuropharmacology* 2007; 53:207-221.
36. Brandt C, Gastens A, Sun M, Hausknecht M and W Löscher. "Treatment with valproate after status epilepticus: Effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats". *Neuropharmacology* 2006; 51:789-804.
37. Contractor A, Mülle C and G Swanson. "Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research". *Trends in Neurosciences* 2011; 34(3):154-163.
38. Xiang-Yu Z, Hong-Liang Z, Qi L, and J Zhu. "Kainic acid-induced neurodegenerative model: potentials and limitations". *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011; 2011:ID457079, 10 pages.
39. Hasson H, Kim M and SL Moshe. "Effective treatments of prolonged status epilepticus in developing rats". *Epilepsy and Behaviour* 2008; 13:62-69.
40. Suzuki S, Kawakami K, Nishimura S, Watanabe Y, Yagi K, Seino M and K Miyamoto. "Zonisamide blocks T-type calcium channel in cultured neurons of rat cerebral cortex". *Epilepsy Research* 1992; 12:21-27.
41. Ricci L, Valoti M, Sgaragli G and M Frosini. "Neuroprotection afforded by diazepam against oxygen/glucose deprivation-induced injury in rat cortical brain slices". *European Journal of Pharmacology* 2007; 561:80-84.
42. Ríos C, Nader-Kawachi J, Rodríguez-Payán AJ y C Nava-Ruiz. "Neuroprotective effect of dapsone in an occlusive model of focal ischemia in rats". *Brain Research* 2004; 999:212-215.
43. Rodríguez E, Méndez-Armenta M, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Barroso-Moguel R, Rodríguez F, Ríos C and A Santamaría. "Dapsone prevents morphological lesions and lipid peroxidation induced by quinolinic acid in rat corpus striatum". *Toxicology* 1999; 139:111-118.
44. Díaz-Ruiz A, Salgado-Ceballos H, Montes S, Guizar-Sahagún G, Gelista-Herrera N, Mendez-Armenta M, Díaz-Cintra S and C Ríos. "Delayed administration of dapsone protects from tissue damages and improves recovery after spinal cord injury". *Journal of Neuroscience Research* 2011; 89:373-380.
45. Birchard, S and R Sherding. "Saunders manual of small animal practice". 3rd Ed. USA: Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri. 2006:1445-1536.
46. García F. "Epilepsia en el perro doméstico, diagnóstico y tratamiento (revisión bibliográfica)" *Tesis de licenciatura UAEM, FMVZ*. 1998:60.
47. Kirby R. "Status Epilepticus". 56^o *Congresso Internazionale Multisala SCIVAC* 2007:294-295.
48. Oliver J, Lorenz M and I Kornegay.: *Handbook of Veterinary Neurology*. 4th Ed. St. Louis Missouri: Saunders. 2004:468.
49. Pellegrino F. "Epilepsia y síndromes epilépticos" En: Pellegrino F, Suraniti A, Garibaldi L. editores. *El Libro de Neurología para la Práctica Clínica*. Argentina: Intermédica 2003: 255-270.

50. Dewey C, Guiliano R, Berg J, Kortz G, Joseph R and S Budsberg. "Zonisamide therapy for refractory idiopathic epilepsy in dogs". *Journal of the American Animal Hospital Association* 2004; 40:285-291.
51. Platt S. "Anticonvulsant use for epileptics". *Proceedings of the WSAVA Congress Mexico City, Mexico* 2005.
52. Podell M. "New advances in the treatment of epilepsy". *Proceedings of the Southern European Veterinary Conference*, 2009.
53. Chandler K. "Canine epilepsy: What can we learn from human seizure disorders?". *The Veterinary Journal* 2006; 172:207-217.
54. Shell L. "Estado de Mal (Status epileptico)" En: Pellegrino F, Suraniti A, Garibaldi L. editores. *El Libro de Neurología para la Práctica Clínica*. Argentina:Intermedica 2003: 255-270.
55. Cochrane S. "Management of status epilepticus in the dog and cat". *Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association*. Sydney, Australia 2007.
56. Florey: Analytical profiles of drug sustancias, *Academic Press New York* 1976; 5:87-114.
57. Baudauri S. en *Index Merck, 11ª Edición* 1984; 444.
58. Wolf R, Tüzün B and Y Tüzün. "Dapsone: unapproved uses or indications". *Clinics in Dermatology* 2000; 18(1):37-53.
59. Wolf R, Matz H, Orion E and Y Tuzun, "Dapsone". *Dermatology Online Journal* 2002; 8(1):2. <http://dermatology.cdlib.org/DOJvol8num1/reviews/dapsone/wolf.htm>
60. Zuidema J, Hilbers-Modderman E and M Merkus. "Clinical Pharmacokinetics of dapsone". *Clinical Pharmacokinetics* 1986; 11:299-315.
61. Mandell G y W Petri. "Fármacos antimicrobianos: usados en la quimioterapia de la tuberculosis, la enfermedad causada por el complejo *Mycobacterium avium* y la lepra" En: Limbird L. *et al* (eds.) Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica* 1996; 9ª edición. McGraw Hill, México.
62. Booth S, Moody C, Dahl M, Herron M and R Nelson. "Dapsone suppresses integrin-mediated neutrophil adherence function". *Journal of Investigation in Dermatology* 1992; 98(2):135-40.
63. Bozeman P, Leatn D and E Thomas. "Inhibition of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase by dapsone". *Biochemical Pharmacology* 1992; 44(3):553-563.
64. Podzamczer D, Salazar A, Jimenez J, Consiglio E, Santin M, Casanova A, Rufi G and F Gudiol. "Intermittent trimethoprim-sulfamethoxazole compared with dapsone-pyrimethamine for the simultaneous primary prophylaxis of *Pneumocystis pneumonia* and toxoplasmosis in patients infected with HIV". *Annals of Internal Medicine* 1995; 122(10):755-61.
65. Payen M, De Wit S, Sommereijns B and N Clumeck. "A controlled trial of dapsone versus pyrimethamine-sulfadoxine for primary prophylaxis of *Pneumocystis carinii pneumonia* and toxoplasmosis in patient with AIDS". *Biomedical Pharmacotherapy* 1997; 51(10):439-445.
66. Sago J and Russell P Hall. "Dapsone". *Dermatologic Therapy* 2002; 15(4):340-351.

67. Sperk G, Lassmann H, Seitelberger F and O Hornykiewicz. "Kainic acid-induced seizures: dose-relationship of behavioral, neurochemical and histopathological changes". *Brain Research* 1985; 338(2): 289-295.
68. Yang L and C Perry. "Zonisamide in Parkinson's disease". *CNS Drugs* 2009; 23(8):703-711.

7. ANEXOS

Anexo I. Clasificación de la epilepsia, causas y pruebas diagnósticas en perros. (Berendt, 2004; Birchard y Sherding, 2006; García, 1998; Kirby, 2007; Oliver *et al.*, 2004)

Clasificación	Causas más frecuentes	Pruebas diagnósticas
Degenerativas	Enfermedades de almacenamiento	Raza, biopsia
Anomalías	Hidrocefalia Lisecefalia	EF, TC, EEG, Ventriculografía Raza, EF, EEG
Idiopáticas	Genética No se conoce	Raza, edad, historia Ausencia de otras causas
Inflamatorias/ Infecciosas	Viral: Distemper canino, rabia Bacterial: cualquier tipo Micótica: criptococosis Protozoarias: toxoplasmosis, neosporosis. Rickettsiosis: fiebre de las montañas rocosas, erliquiosis, meningoencefalitis granulomatosa, meningoencefalitis inmune, parásitos aberrantes.	Historia, EF, análisis LCR
Metabólicas	Electrolíticas: hipocalcemia Carbohidratos: hipoglicemia Falla renal, encefalopatía hepática, Falla hepática, displasia microvascular Hiperlipidemia, eritrocitosis, hipoxia, Hiperlipoproteinemia,	Bioquímica sanguínea, urianalisis, biopsia hepática, ácidos biliares libres, conteo de células sanguíneas completo.
Neoplásicas	Primarias: gliomas, meningiomas Metástasis	Examen Neurológico, TC, RM
Nutricionales	Deficiencia de tiamina	Historia, respuesta al tx
Tóxicas	Metales pesados: organofosforados Hidrocarburos clorhidratados Metaldehídos Estricnina, Tétanos Sapo venenoso 5-hidroxitriptofano	Historia, n. plomo sangre Historia, EN, n. colinesterasa Historia, EN, EF
Traumáticas	Agudas: inmediatamente después de lesión en cabeza, Crónica: semanas o años después de la lesión en cabeza.	Historia, EF, EN, TC, RM Historia, EEG, TC, RM
Vasculares	Arritmias	Historia, EN, TC, Auscultación, ECG

EF= Examen Físico, TC= Tomografía Computarizada, EEG= Electroencefalograma, LCR= Líquido cefalorraquídeo, RM= Resonancia Magnética, EN= Examen Neurológico, ECG= Electrocardiograma, n. = Nivel

Anexo II. Fármacos antiepilépticos utilizados en perros. Modificado de Pellegrino (2003), Dewey *et al* (2004), Platt (2005), Podell (2009) y Chandler (2006).

Fármaco	Mecanismo de acción	Dosis (vía oral)	Comentarios
Fenobarbital	Potencian la acción inhibitoria mediada por GABA, aumentando la frecuencia de apertura de los canales de Cl, hiperpolarizando la membrana	3-5 mg/kg/día en 2 o 3 tomas. La dosis se puede ir incrementado hasta 18-20 mg/kg dividido en 2 o 3 tomas.	Es el fármaco de elección en perros. Requiere un periodo de acumulación de 10-15 d. Se debe revisar en sangre periódicamente.
Benzodiazepinas: Diazepam Clonazepam Clobazam		0.5-1.0 mg/kg c/8h 0.02-0.5 mg/kg c/8h 0.5 mg/kg c/12h	Su utilidad a largo plazo está significativamente limitada en perros por la tolerancia que produce. Se puede combinar con fenobarbital mientras este se acumula en sangre.
Primidona		10-15 mg/kg c/8h	Se transforma en el organismo a fenobarbital y un metabolito activo (feniletilmalónico)
Bromuro de Potasio	Desconocido (hiperpolarización de la membrana, manteniéndola estable contra estímulos excitatorios?)	22mg/kg c/12h (monoterapia) 33mg/kg/día (politerapia)	No se metaboliza en el hígado. Utilizado a menudo en perros refractarios al fenobarbital. Requiere largos periodos (hasta 16 semanas) para alcanzar niveles séricos terapéuticos. Contraindicado en insuficiencia renal.
Felbamato	Antagonista del sitio de reconocimiento de la glicina en receptores NMDA	16-65mg/kg en 3 tomas. 20 mg/kg c/8h	Se alcanza una concentración sérica constante luego de la cuarta dosis. Debido a la ocurrencia de casos de anemia aplásica y toxicidad hepática asociada el futuro de este fármaco es incierto.
Gabapentin	Incierto. Proponen que se une a la subunidad de los canales de calcio voltaje dependientes activados. Podría estar aumentando la síntesis de GABA	De 900 mg a 2g /día c/ 12 h 10mg/kg c/24 aumentando a 10mg/kg d/12. 10 mg/kg 3 veces al día para empezar	Se excreta por vía renal. No se metaboliza en el hígado
Topiramato	Bloquea canales de Na+ Potencia inhibición mediada por GABA. Bloquea liberación de Glutamato.	200-800mg/día (incorporar 50mg/semana)	Tiene un posible efecto inhibitorio de la anhidrasa carbónica
Zonisamida	Los posibles mecanismos de acción incluyen bloqueo de canales de calcio voltaje dependientes	5-10 mg/kg c/12h 8-9 mg/kg c/12h 2-4mg/kg c/12h	Sedación, ataxia, vómito y pérdida del apetito.

Anexo III. Fármacos utilizados para detener el SE en perros. Modificado de Shell (2003), y Cochrane (2008).

Fármaco	Dosis	Comentarios
Diazepam	0.25-1mg/kg IV Perro chico hasta 5mg/kg Perro mediano hasta 10-20 mg IV Razas grandes y gigantes hasta 30-40mg IV La dosis puede repetirse a intervalos de 5-20min hasta 4 veces sino responde se considera que el caso es refractario al diazepam. 0.5-2mg/kg intrarrectal	Es muy liposoluble y penetra en el cerebro de segundos a minutos después de su administración IV. La vida $\frac{1}{2}$ es de 2-4h. Potencian la inhibición presináptica y postsináptica mediada por GABA por su unión a receptores GABA _A . También puede ser administrada vía intrarrectal, se acopla una jeringa a una cánula mamaria plástica de 1 pulgada y se introduce suavemente unos 2 cm dentro del recto. El pico de concentración en plasma es de 15 min y puede ser mantenida por 1h.
Diazepam en goteo continuo	0.5-2 mg/kg/h	Diluir el diazepam en dextrosa al 5% o en solución salina 0.9%. Preparar dosis horarias junto con el volumen estimado.
Pentobarbital	3-15 mg/kg IV lento	Adm. sólo hasta lograr el efecto. Puede deprimir patrones respiratorios, especialmente junto con inyección de diazepam. Puede necesitar la colocación de un tubo endotraqueal. La recuperación puede estar acompañada de sacudidas y gemidos.
Fenobarbital	3-16 mg/h IV	Preparar dosis horarias junto con el volumen estimado de glucosa al 5% o salina al 0.9%. La acción anticonvulsivante ocurre a los 15-20 min. Puede causar depresión respiratoria.
Lorazepam	0.05 mg/kg IV lento	Acción prolongada, puede suprimir las convulsiones por horas. Mayor costo por dosis que el diazepam.
Lidocaína	2 mg/kg IV	Tiene efecto anticonvulsivante de corta duración. No exceder nunca los 5 mg/kg en una sola dosis porque esa posología puede inducir convulsiones.
Fenitoína	2-5 mg/kg IV lento o 1-3mg/kg/h	El efecto anticonvulsivo ocurre en aproximadamente 20 min.
Clonazepam	0.05-0.2 mg/kg IV lento	Benzodiazepina de acción prolongada. Atraviesa la BHE con rapidez similar al diazepam.
Propofol	2-8 mg/kg IV	Aplicar dosis calculada cada 30 seg hasta lograr el efecto deseado. No administrar rápidamente porque puede provocar cianosis. En perros normales se han reportado convulsiones y sacudidas musculares durante la recuperación.

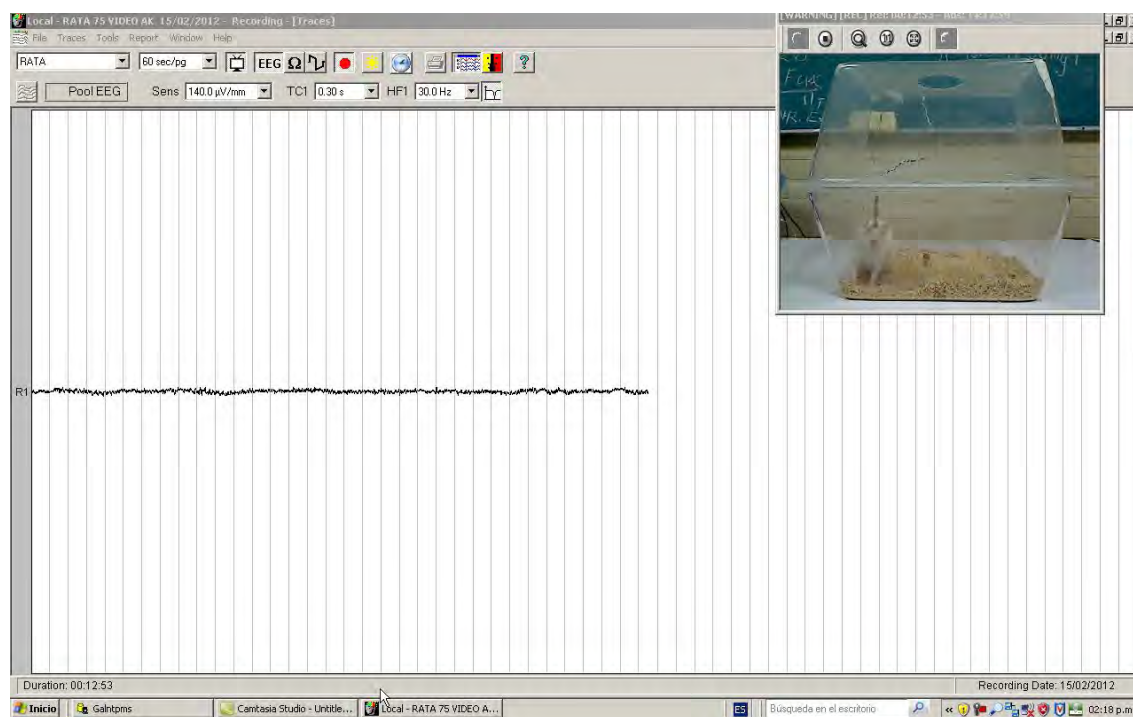
Anexo IV. Características físico-químicas y propiedades terapéuticas de la Dapsona.

Características físico-químicas generales (Baudauri, 1984; Florey 1976)	
Nombre químico	4,4´ diaminodifenil sulfona.
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂ S
Características físicas	Polvo cristalino, blanco o amarillo pálido sin olor.
Solubilidad	Casi insoluble en agua, ligeramente soluble en etanol y muy soluble en acetona.
Características especiales	Producto fotosensible.
Propiedades terapéuticas y mecanismos de acción (Referencias 58-66)	
Propiedades terapéuticas	Recomendada por la OMS para el Tx. contra la lepra, también es utilizado en la profilaxis de Malaria, en desórdenes dermatológicos de origen autoinmune (dermatitis herpetiforme y lupus miliar), artritis reumatoide.
Uso terapéutico antimicrobiano	Las sulfonas tienen actividad bacteriostática, pero no bactericida contra <i>Mycobacterium Leprae</i> .
Mecanismo de acción antimicrobiano	Antagonista del ácido para-aminobenzoico (PABA), impiden que la bacteria utilice de manera normal el PABA en la síntesis de ácido fólico. De modo más específico, son inhibidores competitivos de la dihidropteroato sintetasa, la enzima bacteriana que incorpora PABA en el ácido dihidropteroico, precursor inmediato del ácido fólico. Los microorganismos sensibles sintetizan su propio ácido fólico. La bacteriostasis inducida por las sulfonas es antagonizada en forma competitiva por PABA. Tanto las sulfonas como las sulfonamidas, poseen en promedio el mismo espectro de actividad antibacteriana y ambas son antagonizadas por el ácido para-aminobenzoico.
Uso terapéutico en dermatología	dapsona es un fármaco útil en el tratamiento de enfermedades dermatológicas que cursan con la infiltración de neutrófilos en la piel. Algunas de las enfermedades dermatológicas tratadas actualmente con dapsona incluyen al acné, el pénfigo, la dermatitis herpetiforme y la epidermolísis bulosa.
Mecanismo de acción antiinflamatorio	la dapsona inhibe la unión de leucotrieno B ₄ a neutrófilos, inhibiendo su respuesta quimiotáctica y que además inhibe la síntesis de productos de la 5-lipooxigenasa en los leucocitos polimorfonucleares, bloqueando su efecto inflamatorio ante la reducción en la producción de prostaglandinas y leucotrienos. Previene las lesiones mediadas por la mieloperoxidasa y la eosinofilperoxidasa en tejido, en sitios donde las enzimas peroxidadas son secretadas y diluidas en un medio neutral del espacio intersticial tisular.
Uso en infecciones oportunistas	en pacientes HIV-positivos, la dapsona ha recobrado importancia como un antibiótico oral, cuya combinación con trimetoprim, es aconsejada para el tratamiento de la neumonía por <i>Pneumocystis carinii</i> , y su mezcla con pirimetamina en la prevención de toxoplasmosis, tuberculosis y neumonía por <i>Pneumocystis</i> .
Metabolismo	La acetilación es una de las dos principales rutas del metabolismo de la dapsona. La enzima N-acetiltransferasa, la cual se halla presente en el hígado y en la mucosa del yeyuno, es la responsable de este proceso metabólico. La La hidroxilación es la segunda principal ruta de metabolismo de la dapsona y puede ser la responsable por la de los efectos hematológicos adversos. La N-hidroxilación es efectuada en el hígado por el sistema oxidasa de función mixta del retículo endoplásmico en presencia de oxígeno y NADPH.
Distribución	Las sulfonas se distribuyen en el agua corporal total y están presentes casi en todos los tejidos. Tienden a ser retenidas en piel y músculo y, sobretodo en hígado y riñones; en dichos órganos, se detectan huellas de los fármacos incluso tres semanas después de interrumpir su consumo.
Excreción	Se elimina por orina a una dosis del 70-80% del fármaco
Efectos adversos	Anemia hemolítica y metahemoglobinemia.

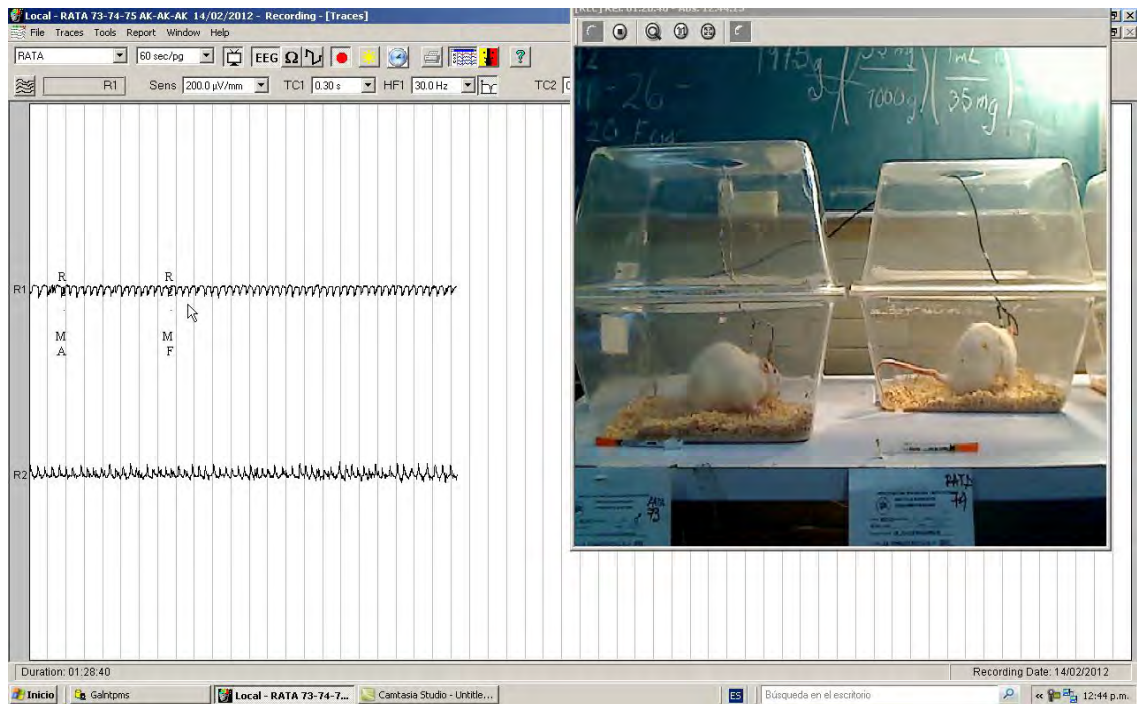
Anexo V. Modelos estandarizados con ácido kaínico en ratas. Tomado de Peterson y Albertson 1998; Xiang-Yu *et al.*, 2011 y Sperk, 1985.

MODELOS ÁCIDO KAÍNICO		
Modelo	Dosis	Daño neuronal
Epilepsia	8 a <10mg/kg	No
<i>Status epilepticus</i>	≥10mg/kg hasta 12 mg/kg	Hipocampo y amígdala
<i>Administración sistémica del AK</i>		
Tiempo post-inyección del AK	Sx. Clínicos	
15-30 min	Movimientos masticatorios, mioclonias faciales y sacudidas de cabeza	
30 min-1 h	SPM (7-8 por min), la actividad epileptiforme (circuito epileptiforme) surge de la corteza entorrinal, y es propagado al sector CA3 del hipocampo, y al complejo amigdaloides	
1 h	Mioclonias de miembros anteriores, progresan a convulsiones motoras recurrentes convirtiéndose a prominentes y generalizadas	
1-2 h	Desarrollan el SE	

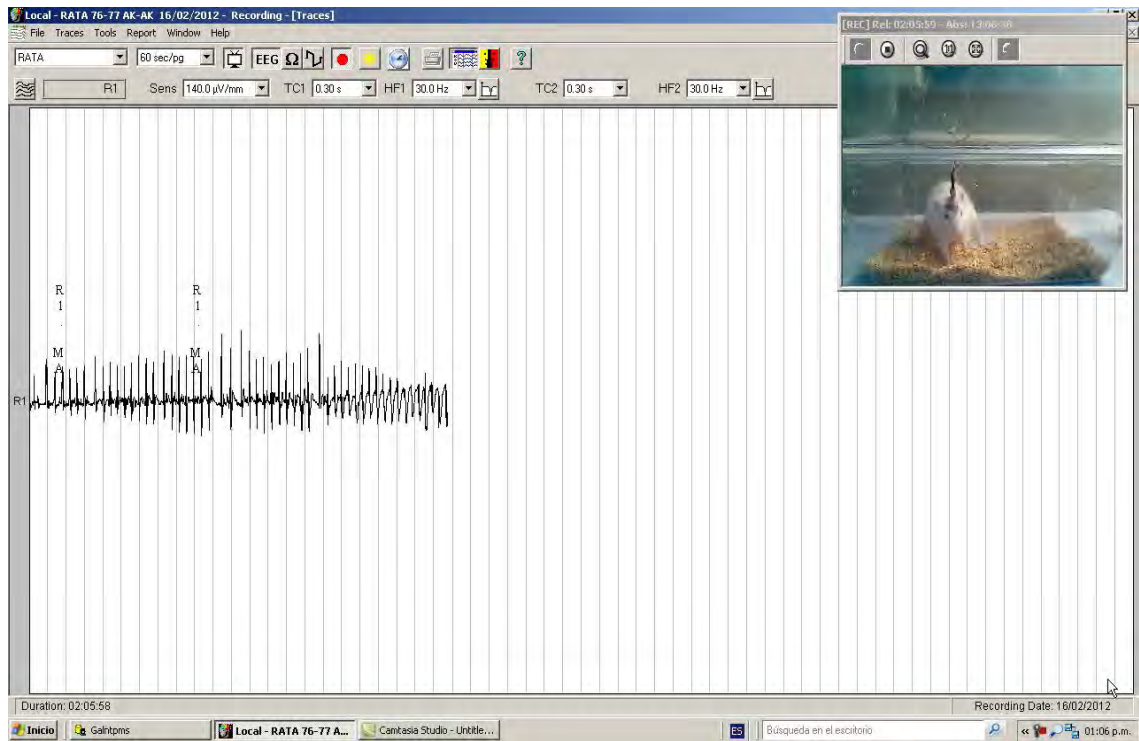
Anexo VI. Niveles basales en el VEEG. La foto muestra los niveles basales de la prueba de VEEG obtenidos antes de administrar el AK (ácido kaínico a una dosis de 12 mg/Kg) para inducir el modelo de SE. El EEG tiene una sensibilidad de 140 μ V/mm.



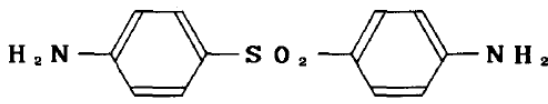
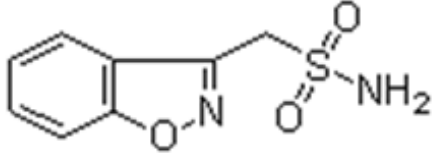
Anexo VII. Comienzo de la actividad eléctrica convulsiva (AEC). Primeras convulsiones sostenidas antes de entrar en SE. Las conductas según la escala de Racine se marcan en el VEEG para hacer para tener un control de las conductas observadas. Mioclonias de miembros anteriores (MA, Fase III); Mioclonias faciales (MF, Fase I). Este registro EEG tiene una sensibilidad de 200 μ V/mm.



Anexo VIII. VEEG del *status epilepticus* (SE). VEEG cuando la rata esta en SE. Las MA (mioclonias de miembros anteriores) se marcan en el VEEG para cuantificar las conductas observadas según la escala de Racine (1972) durante el estudio. La sensibilidad del EEG se encuentra en $140 \mu\text{V}/\text{mm}$.



Anexo IX. Estructura química de la Dapsona y la Zonisamida.

DAPSONA	ZONISAMIDA
	
Estructura química de la dapsona (4,4'-diaminodifenilsulfona)(Hamada <i>et al.</i> , 1991)	Estructura química de la Zonisamida (1,2-benzoxasol-3-metanilsulfomamida) metanilsulfonamida. (Yang y Perry, 2009)