



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**T E S I S**

**“Efecto antioxidante de la restricción alimentaria en el hipocampo de ratas con estado epiléptico inducido por pilocarpina.”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**MARCELINO ALVAREZ HERRERA**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**

**2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesora: GAVILANES RUIZ MARINA

**VOCAL:** Profesora: BRAVO GOMEZ MARIA ELENA

**SECRETARIO:** Profesora: GUEVARA GUZMAN ROSALINDA

**1er. SUPLENTE:** Profesora: MALDONADO JIMENEZ PERLA DEYANIRA

**2° SUPLENTE:** Profesora: LARA NUÑES AURORA

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Departamento de Fisiología; laboratorio sensorial 412 y 414, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad Universitaria

### **ASESOR DEL TEMA:**

Dra. Rosalinda Guevara Guzmán

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

Dr. Octavio Fabián Mercado Gómez

### **SUSTENTANTE:**

Marcelino Alvarez Herrera

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mi asesora de tesis, la doctora Rosalinda Guevara Guzmán, por haberme permitido trabajar en su grupo de investigación e incorporarme en sus proyectos, así como su asesoría a lo largo de este proyecto.

Al doctor Octavio Fabián Mercado Gómez, por haber sido mi supervisor y permitir mi incorporación al proyecto de Restricción Alimentaria, por el apoyo técnico brindado para la realización de los experimentos y revisión de este trabajo, así como por la orientación académica brindada en todo momento.

Al biólogo Jorge Landgrave Gómez, por colaborar en el proyecto de Restricción Alimentaria y por sus aportaciones académicas.

A la QFB Virginia Selene Arriaga Avila, por el apoyo brindado a lo largo de la realización de mi proyecto de tesis y por todos los conocimientos que me compartía durante mi estancia en el laboratorio.

A la doctora Laura Elena Córdova Dávalos, por sus consejos académicos, los cuales me sirvieron para la realización de este proyecto de tesis.

A mis padres Filiberto y Elodia por siempre apoyarme y estar en todo momento si ellos esto no sería posible.

A Yeimmy Zuyenn por acompañarme a lo largo de todo el proyecto gracias de corazón te amo chispis.

A todos mis amigos de carrera y compañeros de laboratorio muchas gracias.

## ÍNDICE

<b>1. ABREVIATURAS.....</b>	<b>3</b>
<b>2. RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1. Epilepsia.....</b>	<b>7</b>
3.1.1 Definición de epilepsia.....	7
3.1.2 Tipos de crisis epilépticas.....	8
3.1.3 Epilepsia del lóbulo temporal.....	9
3.1.4 Hipocampo.....	9
3.1.5 Daño en el hipocampo.....	10
<b>3.2. Modelos experimentales de la epilepsia.....</b>	<b>11</b>
3.2.1 Modelo de epilepsia de litio-pilocarpina.....	13
3.2.2 Escala de Racine.....	16
<b>3.3 Estrés oxidante en las células.....</b>	<b>16</b>
3.3.1 Radicales libres.....	17
3.3.2 Estrés oxidante y epilepsia.....	19
3.3.3 Peroxidación lipídica.....	19
3.3.4 Malondialdehído (MDA).....	20
<b>3.4 Terapias no farmacológicas en epilepsia.....</b>	<b>21</b>
3.4.1 Dietas.....	21
3.4.2 Restricción Alimentaria (RA).....	25
<b>4. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>27</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
5.1 General.....	28
5.2 Específicos.....	28
<b>6. HIPÓTESIS.....</b>	<b>29</b>
<b>7. METODOLOGÍA.....</b>	<b>30</b>
7.1 Modelo de Restricción Alimentaria.....	30
7.2 Medición del peso corporal, glucosa y $\beta$ -hidroxibutirato.....	31
7.3 Modelo agudo de crisis epilépticas.....	31
7.4 Cuantificación de malondialdehído (MDA).....	32
7.5 Cuantificación de proteínas por el método de ácido bicinconínico.....	33
7.6 Determinación del radical superóxido en hipocampo.....	33
7.7 Análisis estadístico.....	33

<b>8.RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
8.1 Influencia de la restricción alimentaria sobre el peso corporal.....	34
8.2 Influencia de la restricción alimentaria sobre la concentración de glucosa y $\beta$ -hidroxibutirato en sangre.....	35
8.3 Efecto anticonvulsivo de la restricción alimentaria.....	37
8.4 Contenido de malondialdehído en el hipocampo.....	38
8.5 Determinación del radical superóxido en hipocampo.....	40
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>10. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
<b>11. ANEXO.....</b>	<b>50</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>58</b>

## 1. ABREVIATURAS

**1M2F** 1-Metil-2-Fenilindol

**AL** Ad libitum

**AL-P** Ad libitum más la administración de pilocarpina

**ATP** Adenosín trifosfato

**β** Beta

**BCA** Ácido bicinconínico

**BHB** Beta hidroxibutirato

**Ca<sup>2+</sup>** Ion calcio

**CA** Cuerno de Ammon

**DC** Dieta cetogénica

**DHE** Dihidroetidio

**DNA** Ácido Desoxirribonucleico

**ELT** Epilepsia del lóbulo temporal

**FAE** Fármacos antiepilépticos

**GABA** Ácido gama-amino butírico

**GD** Giro Dentado

**h** Hora

**HDACs** Desacetilasas de histonas.

**ILAE** Liga internacional en contra de la epilepsia

**im** Intramuscular

**ip** Intraperitoneal

**KA** Ácido kaínico

**KCl** Cloruro de potasio

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** Fosfato monobásico de potasio

**LiCl** Cloruro de litio

**MDA** Malondialdehído

**min.** Minutos

**mL** Mililitro

**mM** Milimolar

**mTOR** Diana mecanística de rapamicina.

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** Fosfato dibásico de sodio

**NaCl** Cloruro de sodio

**nm** Nanómetro

**nM** Nanómolar

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**PBS** Amortiguador de fosfatos

**RA** Restricción Alimentaria

**RA-P** Restricción Alimentaria más la administración de pilocarpina

**RC** Restricción calórica

**RNA** Ácido Ribonucleico

**ROS** Especies reactivas de oxígeno

**rpm** Revoluciones por minuto

**SE** *Status Epilepticus*

**SNC** Sistema Nervioso Central

**TBARS** Ensayo de ácido tiobarbitúrico

**TMPO** Tetrametoxipropano

**$\mu\text{M}$**  Micromolar

**$\mu\text{L}$**  Microlitro

## 2. RESUMEN:

La epilepsia afecta a personas de todo el mundo y se caracteriza por convulsiones recurrentes y espontáneas que afecta aproximadamente a 70 millones de personas, correspondiente al 1-2 % de la población mundial (Organización Mundial de la Salud, OMS, 2016). A la fecha, se conoce que aproximadamente un tercio de los pacientes con epilepsia no responden a los fármacos antiepilépticos para controlar las crisis convulsivas características de este padecimiento. Por otra parte, se conoce que en el SE, la producción de especies reactivas de oxígeno se ve aumentada por lo cual es importante investigar si el modelo de restricción alimentaria podría tener un efecto antioxidante posterior a la inducción del SE; razón por la cual, en este trabajo de tesis se planteó el objetivo de investigar si la restricción alimentaria -una terapia basada en el metabolismo- podría generar un efecto antioxidante post *status epilepticus* (SE). Hallazgos previos en el laboratorio sugieren que la restricción alimentaria es capaz de modular la actividad de componentes involucrados en la regulación del metabolismo energético. Para esto, se usaron cuatro grupos experimentales: un grupo de ratas tuvo acceso ad libitum (AL) al alimento; otro siguió un régimen de restricción alimentaria (RA); otro que tuvo acceso ad libitum y que recibió una inyección de pilocarpina (AL-P); y el último el cual fue sujeto a restricción alimentaria y que recibió una inyección de pilocarpina (RA-P). Para inducir el SE, se utilizó el modelo de litio-pilocarpina y a través de un curso temporal agudo, se disecó tejido cerebral, en particular el hipocampo, para la cuantificación de productos de lipoperoxidación (malondialdehído) y el radical superóxido. Nuestros resultados demuestran que la restricción alimentaria es capaz de ejercer un efecto antioxidante (disminución en los niveles de malondialdehído y de especies reactivas de oxígeno) y un efecto anticonvulsivo disminuyendo la severidad de las crisis 24 horas después del SE en la región de hipocampo.

### **3. INTRODUCCIÓN:**

La palabra “epilepsia” deriva del griego ἐπιληψία, que significa crisis, y a su vez proviene del término (epilambanein), que significa convulsionar. Esta enfermedad representa la segunda causa más importante de consulta neurológica, después de las cefaleas. Sus consecuencias van más allá de las alteraciones que se producen durante la crisis convulsiva, ya que también se asocia a una estigmatización social y a una problemática psicológica, familiar y económica importante (Rocha, 2005). Esta patología afecta a personas de todo el mundo y se caracteriza por convulsiones recurrentes y espontáneas, que afecta aproximadamente a 70 millones de personas (correspondiente al 1-2% de la población mundial) (OMS, 2016).

#### **3.1. Epilepsia**

##### **3.1.1 Definición de epilepsia**

La Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) por sus siglas en inglés, define a la epilepsia como “un trastorno del cerebro caracterizado por una predisposición permanente para generar crisis de epilepsia, y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas, y sociales de esta condición”. El diagnóstico de epilepsia requiere la aparición de al menos dos crisis epilépticas (Fisher, 2014). Dicho autor menciona que es importante no confundir la epilepsia con otros términos como lo son las crisis y el *status epilepticus* o estado epiléptico (SE).

Una crisis epiléptica es una aparición transitoria de signos y/o síntomas anormales excesivos, y de una actividad sincrónica neuronal en el cerebro. Éstos pueden ser eventos aislados o agudos, los cuales no están asociados con la epilepsia, mientras que aquellos que se presentan de forma espontánea y/o crónica son considerados como parte de la epilepsia (Fisher, 2014). En cambio, el SE consta de la alteración continua de la conciencia: puede ser una sola convulsión prolongada o convulsiones repetidas sin recuperación de la conciencia entre convulsiones (Dulac y Takahashi, 2013).

La OMS denomina el SE a las crisis epilépticas que se repiten en un intervalo corto de tiempo o son lo suficientemente prolongadas, como para condicionar un estado epiléptico fijo y duradero. En la clínica se considera una emergencia médica que se puede presentar en algunos pacientes con epilepsia, con un alto índice de mortalidad si no es controlada a tiempo (Dulac y Takahashi, 2013).

### 3.1.2 Tipos de crisis epilépticas

Aunque las manifestaciones de la epilepsia son múltiples, variadas y dependen fundamentalmente del lugar del cerebro donde se inicia la descarga eléctrica anormal de las neuronas, la ILAE ha clasificado las crisis epilépticas en tres tipos: generalizadas, focales o localizadas y desconocidas (ver tabla 1).

Tabla 1: Tipos de crisis descritas en la clasificación 2010 (Berg et al., 2010), Modificado de Tratamiento Farmacológico de las Epilepsias (Terra y Sakamoto, 2014).

---

<b>Crisis generalizadas</b>
Tónico-clónicas (en cualquier combinación)
Ausencias
Típicas
Atípicas
Ausencias con características especiales
Ausencias mioclónicas
Mioclonías palpebrales
Mioclónicas
Mioclónicas atónicas
Mioclónicas tónicas
Clónicas
Tónicas
Atónicas
<b>Crisis focales</b>
<b>Desconocido</b>
Espasmos epilépticos
Crisis que no pueden ser claramente diagnosticadas en una de las categorías anteriores deben ser consideradas no clasificadas hasta tanto no se cuente con suficiente información que permita su diagnóstico preciso. Sin embargo, ésta no es considerada una categoría de clasificación.

---

Crisis generalizadas: son aquellas caracterizadas por descargas neuronales anormales en ambos hemisferios, con pérdida de la conciencia desde el principio y aparición de fenómenos autónomos generales asociados a convulsiones (Terra y Sakamoto, 2014).

Crisis parciales: también denominadas crisis focales, son un grupo de crisis en las cuales las descargas neuronales se hallan localizadas en un determinado lugar del cerebro (foco epileptogénico), involucran inicialmente sólo un hemisferio cerebral de forma localizada o difusa en ese hemisferio, pudiendo iniciarse en las estructuras subcorticales, para extenderse a neuronas interconectadas. Las crisis focales pueden presentarse con o sin alteración de la conciencia; cuando hay alteración de la conciencia también se le conoce como crisis parcial compleja y se origina por una anomalía intrínseca del lóbulo temporal donde se involucran estructuras cerebrales del sistema límbico (Feria-Romero et al., 2013).

### 3.1.3 Epilepsia del lóbulo temporal

La epilepsia del lóbulo temporal (ELT), es el tipo de epilepsia más frecuente que se presenta en el ser humano (aproximadamente el 40% de todos los pacientes con epilepsia) (Reddy y Kuruba, 2013). La ELT se clasifica así porque el área cortical involucrada (lóbulo temporal) es comúnmente el foco epileptogénico.

En la ELT, las crisis epilépticas que se presentan son de tipo convulsivo tónico-clónicas generalizadas. El término tónicas se refiere a contracciones sostenidas y, clónicas: que son movimientos repetitivos de un grupo muscular (Rocha, 2005). La ELT se caracteriza por el desarrollo de un foco epiléptico en estructuras del lóbulo temporal, en las que se incluyen al hipocampo. Esta estructura cerebral es fundamental para el aprendizaje y la memoria, así como para los aspectos emocionales de la conducta. La memoria puede deteriorarse si el foco epiléptico está en ambos lóbulos temporales (Blume, 2003).

### 3.1.4 Hipocampo

De las estructuras que se relacionan con la ELT, el hipocampo probablemente es la más importante desde el punto de vista fisiopatológico debido a que se puede observar o no esclerosis hipocampal; principalmente, muerte neuronal debida a una despolarización masiva y gliosis reactiva (Oroquieta et al., 2002; Miranda y Godoy, 2006). Las crisis que se inician a temprana edad son suficientes para causar epilepsia y daño hipocampal, pues los eventos moleculares y celulares que

acompañan a las crisis en esta etapa pueden predisponer al cerebro a inducir nuevas crisis futuras que causen daño cerebral (Koh et al., 2001).

El hipocampo se divide en la zona del cuerno de Ammon (CA), principalmente en las áreas CA1, 2, 3 y 4 así como en el giro dentado. A esta estructura también se le conoce como circuito tresináptico, debido a que abarca tres diferentes vías; la primera comienza en la corteza entorrinal y proyecta hacia las células granulares del giro dentado; la segunda vía proyecta desde las células granulares del giro dentado hacia el área 3 (CA3) a las células piramidales; y la última vía, que conforma el circuito presináptico, parte de CA3 hacia la zona de CA1 (Figura 1).

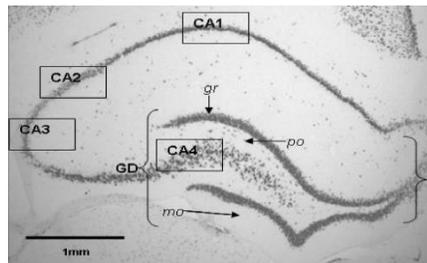


Figura 1. Corte coronal de un hipocampo de rata. CA = Cuerno de Amon (CA1, CA2, CA3 y CA4) formada principalmente por células piramidales y GD= dentado. Diferentes tipos celulares contenidos en el hipocampo: gr = capa de células granulares; po = capa de células polimórficas, que incluye células piramidales; y, mo = capa molecular que incluye células fusiformes.

### 3.1.5 Daño en el hipocampo

Tanto desde el punto de vista electrofisiológico como anatómico, el hipocampo es la estructura más estudiada en la ELT y los daños producidos en esta estructura se caracterizan principalmente en las zonas CA1, CA3 y CA4 y giro dentado, traducidos en muerte celular. Esto debido a la entrada masiva del ión  $Ca^{2+}$  a las células piramidales, granulares e interneuronas, producida a la despolarización masiva que se presenta en la epilepsia (Fritschy et al., 1999; Cabo de la Vega et al., 2006; Pastor et al., 2006).

### **3.2 Modelos experimentales de la epilepsia.**

El estudio de las enfermedades se ha llevado a cabo mediante modelos experimentales que se desarrollan en los laboratorios de investigación que permiten la reproducción de la patología a estudiar, ya sea para probar fármacos o desarrollar tratamientos que permitan el control de la enfermedad.

El objetivo principal de estos modelos es el estudio de los mecanismos básicos que permitan conocer con precisión los diferentes tipos de manifestaciones de las enfermedades o los mecanismos cerebrales que subyacen en ellas. Con el paso de los años, se han desarrollado diversos modelos para estudiar la epilepsia de acuerdo al tipo de crisis que desea estudiarse, empleando animales para el estudio, debido a que esto permite de manera más efectiva el control de muchas variables (Cole et al., 2002).

Existen muchos modelos para estudiar la epilepsia, los cuales brindan la oportunidad de estudiar sus características fisiopatológicas. Algunos utilizan estimulación eléctrica en ciertas zonas del cerebro, otros emplean sustancias químicas que producen excitación en determinadas zonas del cerebro, ya sea por estimulación o por administración de sustancias químicas, se producen ciertas manifestaciones clínicas de las crisis que pueden ser: movimientos tónico-clónicos, sacudida de extremidades superiores e inferiores, aunque haya o no presencia de descargas neuronales (Ferreira et al., 1999).

Los modelos experimentales ofrecen diversas ventajas como son:

- Estudiar características fisiopatológicas.
- Estudiar la relación entre el daño cerebral provocado por la misma enfermedad y marcadores moleculares.
- Estudiar los efectos de las crisis recurrentes.
- Generar material biológico y examinarlo después de que ocurren las crisis.
- Estudiar las consecuencias de la enfermedad.

De acuerdo con lo anterior, los modelos experimentales son un recurso de gran utilidad en la investigación de la epilepsia (Cole et al., 2002). En la siguiente tabla se enlistan los modelos que más se emplean para producir epilepsia:

**Tabla 2. Modelos más empleados para producir epilepsia. Modificado de Zavala y López. (2011).**

<b>Modelo</b>	<b>Agente pro-epiléptico</b>	<b>Tipo de actividad epiléptica generada</b>
Químico	Ácido kaínico	Crisis parciales complejas generalizadas, status epilepticus
	Pilocarpina	Crisis parciales complejas generalizadas, status epilepticus
	Pentilentetrazol	Crisis clónico-tónicas generalizadas
		Crisis parciales complejas generalizadas
		Crisis de ausencia
	Glutamato monosódico	Crisis tónico-clónicas generalizadas
	Fluoroetil	Crisis clónico-tónicas generalizadas
Toxina tetánica	Crisis generalizadas	
Físico	Kindling eléctrico	Crisis parciales complejas generalizadas
	Generación de postdescargas corticales	Crisis parciales complejas o crisis mioclónicas
	Electrochoques	Crisis mioclónicas o crisis tónico-clónicas
	Hipertermia	Crisis parciales complejas generalizadas
	Hipoxia	Crisis clónico-tónicas
Genético	Ratas GAERS (Genetic absence epilepsy rat from strasbourg)	Crisis de ausencia
	Ratas WAG/Rij (Wistar absence glaxo rat)	
	Ratas GEPR (Genetically epilepsy-prone rats)	Crisis convulsivas (clónicas/tónico-clónicas)

Los dos modelos más usados para estudiar la epilepsia del lóbulo temporal en animales de laboratorio, son la estimulación eléctrica o kindling y el modelo de estado epiléptico en el que se inyectan sustancias convulsionantes como el ácido kaínico y la pilocarpina (Pastor et al., 2006).

La inducción del *status epilepticus* (SE) en ratas con pilocarpina es un modelo de epilepsia experimental ampliamente utilizado, debido a su similitud con la fisiopatología de la ELT (Cavalheiro, 1995).

### 3.2.1 Modelo de epilepsia de litio-pilocarpina

Es uno de los modelos farmacológicos más usados para la inducción de ELT en animales; está basado en la administración de pilocarpina, cuya activación repercute en la inducción de un estado de hiperexcitabilidad neuronal en las células musgosas y en las piramidales de la región CA1 y CA3, localizadas principalmente en el hipocampo, generando un patrón característico de descargas eléctricas que resultarán en un estado epiléptico. Además, los cambios morfológicos que ocurren en el hipocampo seguido del SE son bastante similares a los observados en ELT humano, aunque el daño en el modelo animal puede ser más grave y generalizado (Morimoto et al., 2004).

La pilocarpina es un alcaloide que se obtiene de las hojas de los arbustos de *Pilocarpus sp.* (Figura 2). Es un potente agonista colinérgico muscarínico, no-selectivo de los receptores muscarínicos con acción parasimpaticomimética (mimetizan la acción de la acetilcolina sobre receptores muscarínicos) (Rang y Dale, 2012). Se utiliza para la inducción de modelos experimentales de SE para estudiar las lesiones cerebrales inducidas por convulsiones y otros mecanismos de neurofisiopatología (Tsai et al., 2008).

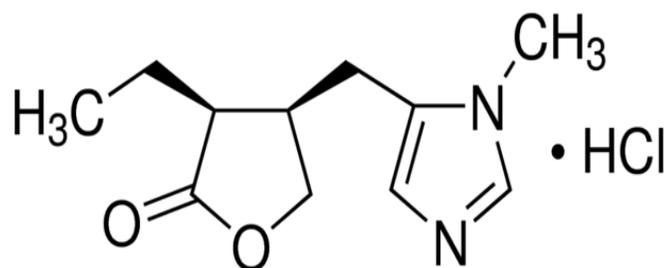


Figura 2. Fórmula química del compuesto convulsivante pilocarpina. ( $C_{11} H_{16} N_2 O_2 \cdot HCl$ ), su peso molecular es de 244.72 g/mol.

El modelo de SE con pilocarpina como agente convulsivante se ha utilizado ampliamente desde su primera descripción en la década de los ochentas por Turski y colaboradores quienes observaron una relación entre la estimulación excesiva de los receptores colinérgicos por la pilocarpina en el cerebro y daño cerebral generado en condiciones de epilepsia (Turski et al., 1983).

Anteriormente, no se sabía mucho del mecanismo por el cual la pilocarpina puede inducir SE, ya que los estudios realizados daban ideas claras de que se creía que dependía de la activación del subtipo de receptor muscarínico M1, debido a que en los ratones knockout del receptor M1 no se desarrollan convulsiones en respuesta a la pilocarpina (Hamilton et al., 1997). En la actualidad, se sabe la pilocarpina es un agonista no específico de los receptores muscarínicos (M1) en el sistema parasimpático (Grone y Baraban, 2015).

La pilocarpina puede administrarse de dos formas, 1) en dosis altas (300-400 mg/Kg de peso); y, 2) en dosis bajas (30-60 mg/Kg de peso), pero con la administración de cloruro de litio (LiCl, 3 mEq/Kg de peso) entre 16 y 24 horas previas a la administración de la pilocarpina. Sin embargo, se ha observado que la administración de la dosis alta de pilocarpina genera un porcentaje mayor de muerte en los animales de experimentación (Curia et al., 2008). Por otra parte, el uso de LiCl fue ideado para mejorar la supervivencia de los animales, ya que con esta combinación, la dosis de pilocarpina se puede disminuir en aproximadamente 10 veces (Marchi et al., 2009).

Marchi y cols. (2009) reportaron que el aumento de la susceptibilidad de las ratas a la pilocarpina después del tratamiento de litio se debe a un aumento en la respuesta inflamatoria primaria mediada por citocinas pro-inflamatorias como la interleucina (IL-1) y a consecuentes daños a la barrera hematoencefálica. Los animales se tratan previamente con metilnitrato de escopolamina (1 mg/Kg), un antagonista muscarínico por vía subcutánea (s.c.) para prevenir los efectos periféricos de pilocarpina (Reddy y Kuruba, 2013).

La mayoría de las características pueden reproducirse en modelos animales de ELT, particularmente en modelos de estado epiléptico como lo es el de litio-pilocarpina, que bien pueden ser el modelo homólogo ideal, ya que está bien establecido y comparte muchas de las características de ELT humano (Morimoto et al., 2004).

Las convulsiones aún no están bien controladas por los fármacos antiepilépticos existentes, por lo que es importante contar con modelos de roedores tratados con pilocarpina para seguir analizando nuevas alternativas. Curia y colaboradores en 2008 nos mencionan algunas características importantes del modelo de pilocarpina:

- Inducción aguda del SE rápidamente vía intraperitoneal (ip).
- La presencia de un período de latencia seguido por la aparición de convulsiones recurrentes espontáneas.
- Aparición de daño generalizado, algunos de ellos localizados en las mismas áreas cerebrales afectadas en pacientes ELT y las regiones del hipocampo.

Tomando en cuenta las características anteriores es importante saber que el modelo de pilocarpina con o sin litio se emplea para mimetizar la ELT en humanos ya que, como se había mencionado anteriormente, comparten varias similitudes. Así, el modelo ha sido llamado "modelo epiléptico post-estado de ELT" (Marchi et al., 2009).

Por otra parte, a pesar de que en las últimas décadas se han hecho importantes avances en el campo de la epilepsia, aún quedan muchos aspectos que hay que explorar, así como nuevas alternativas terapéuticas que probar. Para esto, los modelos experimentales son una herramienta muy útil para el avance en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos y en la búsqueda de tratamientos eficaces (García-García et al., 2009).

### 3.2.2 Escala de Racine

Para medir la intensidad de las convulsiones en modelos de roedores sometidos a un protocolo experimental de inducción de epilepsia, se ha utilizado desde hace varios años una herramienta conductual muy útil propuesta por Ronald J. Racine en 1972 (escala de Racine). En dicha escala se categorizan seis estados o etapas de intensidad; en la primera se pueden observar acinesia y piloerección masticación así como movimientos faciales; en la segunda se advierte el cabeceo; la tercera etapa es denominada *clonus*; mientras que en la cuarta etapa, el roedor comienza con las crisis (sacudida de extremidades superiores e inferiores); en la quinta etapa, el animal pierde el equilibrio; y en la sexta etapa, puede presentarse la muerte del roedor (Racine, 1972; Lüttjohann et al., 2009).

### 3.3 Estrés oxidante en las células.

El equilibrio entre la producción de moléculas pro-oxidantes y la capacidad de los antioxidantes para contrarrestar los efectos de los radicales libres en los sistemas biológicos, se conoce como balance de óxido-reducción o balance redox, el cual en condiciones fisiológicas puede activar vías de señalización con el objetivo de mantener la homeostasis celular (Valko et al., 2007).

El aumento significativo de los radicales libres conduce a la pérdida de este equilibrio redox, el cual es definido comúnmente como estrés oxidante. Durante el estrés oxidante, ocurren alteraciones de las funciones celulares tales como la disfunción mitocondrial, la activación de la apoptosis, el bloqueo en la diferenciación celular y la activación desordenada del ciclo celular. Es muy

conocido que el estrés oxidante se encuentra presente en el desarrollo de diversas enfermedades crónico-degenerativas (Uttara et al., 2009).

El estrés oxidante es la condición que se produce cuando el equilibrio de estado estacionario entre pro-oxidante y antioxidante se desplaza en dirección de la primera, creando el potencial para el daño orgánico. Los pro-oxidantes son por definición, radicales libres, átomos o grupos de átomos con un electrón no apareado (Torres-Aguilar et al., 2012). Las reacciones redox son en su mayoría producto del metabolismo, principalmente a nivel de las mitocondrias, en donde se llevan a cabo las reacciones para obtener la energía (ATP), esto por medio de la descomposición oxidativa de nutrientes (carbohidratos, amino-ácidos y grasas) (Robert y Robert, 2015).

### 3.3.1 Radicales libres

Los radicales libres son especies químicas que son capaces de existir independientemente y poseen uno o más electrones desapareados. Esta cualidad hace que sean muy reactivos y puedan captar electrones de moléculas adyacentes (McCord, 2000). Una vez que un radical libre ha sustraído un electrón, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre al quedar con un electrón desapareado, iniciándose así la transmisión del daño a través de una reacción en cadena entre las biomoléculas.

Los radicales libres más comunes en la fisiología celular son los derivados del oxígeno ( $O_2$ ), los cuales dan origen a las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés de reactive oxygen species). Esta especies reactivas pueden o no ser radicales y pueden o no estar cargadas. Entre los más importantes se encuentran el radical hidroxilo, el radical superóxido, el óxido nítrico y otras especies reactivas que aunque no son un radical también son capaces de causar daño; tal es el caso del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La vida media biológica de un radical libre es muy corta, pero tiene la capacidad de reaccionar rápidamente

con lo que esté a su alrededor provocando oxidación en las moléculas de membranas celulares u otras biomoléculas.

La producción de radicales libres es continua en las células, esto se debe, como se había mencionado anteriormente, a la producción de ROS que se da durante las reacciones metabólicas (Robert y Robert, 2015). Existen mecanismos que tratan de contrarrestar estos efectos, como es el caso del sistema antioxidante. El problema se produce cuando resulta insuficiente la actividad de las defensas antioxidantes y los mecanismos de reparación y celular, estableciéndose así un estado de estrés oxidante (Finkel y Holbrook, 2000).

Por otra parte, las ROS pueden generarse mediante dos vías, endógena y exógena. En la vía endógena se producen principalmente como resultado del metabolismo aeróbico que tiene lugar en la cadena de transporte de electrones dentro de la mitocondria; sin embargo, también se generan en el retículo endoplásmico y en otros organelos celulares, tales como los peroxisomas. En la vía exógena se producen como resultado de la exposición a diversos factores ambientales, entre los que destacan la radiación ionizante, la exposición a metales, el contacto con pesticidas, el tabaquismo y la contaminación ambiental (Avello y Suwalsky, 2006).

En la actualidad existen, ensayos para poder determinar la producción de radicales libres. Uno muy popular es el de la detección del radical superóxido ( $O_2^-$ ), en células y tejidos usando una técnica basada en fluorescencia derivada de la oxidación de dihidroetidio (DHE) (Zhao et al., 2003). La medición de este radical es de suma importancia ya que de las especies reactivas de oxígeno que contribuyen y desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la muerte excitotóxica se debe al radical superóxido (Patel et al., 1996).

### 3.3.2 Estrés oxidante y epilepsia

La producción de ROS tiene un papel fundamental en la regulación de la función biológica; influye en daños a las estructuras celulares, así como en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central, tales como la enfermedad de Parkinson, accidentes cerebrovasculares y demencias (Kong y Ling, 2010; Malinska et al., 2010).

Se sabe que el cerebro es particularmente vulnerable al daño inducido por el estrés oxidante debido a una gran cantidad de mitocondrias, un alto grado de lípidos y metales oxidables, un alto consumo de oxígeno y menor capacidad antioxidante que otros tejidos haciendo que el estrés oxidante contribuya probablemente en los trastornos neurológicos como la epilepsia (Waldbaum y Patel, 2009). Las ROS son parte integral de los procesos tales como la excitotoxicidad y apoptosis que contribuyen al daño cerebral inducido por las convulsiones (Patel y Waldbaum, 2010).

Los ácidos grasos poliinsaturados presentes en los fosfolípidos de las membranas biológicas son altamente susceptibles a la oxidación por ROS. La oxidación no específica de ácidos grasos poliinsaturados, conocidos como peroxidación de lípidos, es una ruta mediada por radicales libres y se utiliza como un índice de daño neuronal irreversible de fosfolípidos de la membrana celular (Dal-Pizzol et al., 2000).

### 3.3.3 Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es una reacción en cadena que ocurre durante el estrés oxidante que conduce a la formación de varios compuestos activos incluyendo malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-nonenal (HNE), dando como resultado el daño celular. Estos productos de la lipoperoxidación pueden ser producidos por cualquier ROS debido a que extraen un átomo de hidrógeno de la cadena lateral de un ácido graso poliinsaturado que son los que se encuentran en las membranas celulares, tal como el ácido araquidónico, que es un ácido poliinsaturado presente en las membranas celulares del cerebro, los músculos e hígado (Singh y Kaur, 2014).

### 3.3.4 Malondialdehído (MDA)

Existe una variedad de ensayos de lipoperoxidación que se han utilizado como evidencia de daño causado por radicales libres en procesos neuropatológicos (Patel y Waldbaum, 2010), uno de estos consiste en la determinación de MDA por medio de métodos colorimétricos.

El MDA es un producto de daño oxidante a lípidos, aminoácidos y ácido desoxirribonucleico (ADN), y se acumula durante el envejecimiento y en enfermedades (Long y Wang, 2006). El MDA ha sido ampliamente utilizado como un marcador de lipoperoxidación en la epilepsia, así como, en el estado epiléptico encontrado un aumento posterior a las dos horas después de inducido el SE con pilocarpina en la corteza cerebral e hipocampo (Tejada et al., 2007).

El MDA es un biomarcador útil para la peroxidación lipídica y el estrés oxidante. Tomando como primicia lo anterior, en las siguientes líneas se describen trabajos de diferentes investigadores que han usado el ensayo de MDA como un parámetro de estrés oxidante para diferentes modelos de daño en epilepsia (Singh y Kaur, 2014).

Con el ensayo de ácido tiobarbitúrico (TBARS) existe un aumento en la oxidación de lípidos después del SE inducido por ácido kaínico (KA) a las cuatro horas en corteza, hipocampo, ganglios y cerebelo, el cual, se mantuvo elevado hasta las 24 h posteriores a la inducción del SE (Gluck et al., 2000). De manera interesante, en el modelo de kindling, los niveles de MDA también se han reportado aumentados en ambos hemisferios 24 h posterior al SE (Frantseva et al., 2000).

Existen reportes en donde se analizan las distintas regiones del hipocampo como en el reporte de Pestana y colegas (2010), en donde observaron un aumento en la generación de ROS en las regiones CA1, CA3 y giro dentado 24 h después de la inducción del SE (Pestana et al., 2010). El aumento de estrés oxidante en el modelo de litio-pilocarpina podría tener un papel fundamental en la neurodegeneración del hipocampo, ya que se ha demostrado que los niveles de lipoperoxidación y el contenido de nitrito en el cerebro de ratas adultas se

incrementan después de inducidas las convulsiones por pilocarpina (Méndez-Armenta et al., 2014).

Estos estudios solo son una muestra de los muchos que existen en la que se han demostrado los cambios en niveles de lipoperoxidación post SE, los cuales se pueden ver aumentados desde tiempos agudos. De este modo, la cuantificación de MDA puede utilizarse como una herramienta confiable para evaluar los niveles de estrés oxidante (Singh y Kaur, 2014). Lo anterior lo convierte en un parámetro importante que junto con la detección de superóxido pueden ser estudiados en la prueba de nuevos fármacos antiepilépticos, así como dietas alternativas a las ya conocidas, como es el caso en este tema de tesis.

### **3.4 Terapias no farmacológicas en epilepsia**

A pesar de los enormes avances en el diagnóstico y tratamiento de la epilepsia en niños y adultos, así como la introducción de nuevos fármacos antiepilépticos (FAE), aún existen pacientes que permanecen con crisis no controladas y tienen opciones limitadas para el tratamiento. En este sentido, aproximadamente el 30% del total de todos los pacientes con ELT son fármacorresistentes y, por tanto, la necesidad de usar terapias alternativas distintas a los fármacos antiepilépticos, como las dietas metabólicas serían de gran utilidad (McNally y Hartman, 2012). Es muy importante distinguir el término epilepsia refractaria de epilepsia intratable. Por intratable se entiende la condición imposible de ser tratada en cualquier naturaleza o modalidad, mientras que refractariedad o fármacorresistencia se refiere a los casos de epilepsia en que no hay respuesta adecuada al tratamiento con los FAE convencionales. (Ferreira-Caboclo, 2014; Brito-Sampaio, 2014).

#### **3.4.1 Dietas**

En el pasado, muchas dietas, mejor conocidas como "curas" para la epilepsia, se desarrollaron y tales tratamientos incluían el exceso o la limitación de casi todas las sustancias (animal, mineral o vegetal). Además, mientras que el ayuno ha sido reconocido como un tratamiento para muchas enfermedades durante más de dos

mil quinientos años, el ayuno como un tratamiento para las convulsiones es menos reconocido (Wheless, 2008).

Wilder en 1921 propuso una dieta denominada dieta cetogénica (DC), con la cual trató una serie de pacientes con epilepsia. Sugirió que la dieta debe ser tan eficaz como el ayuno y que podría mantenerse por un período de tiempo mucho más largo (Wheless, 2008).

Las terapias no farmacológicas como la DC se han explorado como una alternativa para disminuir las convulsiones, teniendo como objetivo la bioenergética mitocondrial y el metabolismo (Patel y Waldbaum, 2010). Aunque ya conocida por los médicos desde los tiempos de Hipócrates y referida en la Biblia como efectiva para el control de las crisis (por medio del ayuno y las oraciones), la DC florece en la década de 1920 como una opción terapéutica que, incluso en nuestros días, también se ha explorado como alternativa al tratamiento con fármacos antiepilépticos.

La "DC clásica" es una terapia de amplio espectro para la epilepsia médicamente intratable y consiste en un alto contenido de grasa y baja en carbohidratos (relación 4:1); sin embargo, en la actualidad hay variantes de esta dieta donde la cantidad disminuye un poco, y la cantidad de proteína aumenta respetando el bajo contenido de carbohidratos (Gano et al., 2014). Se utiliza particularmente en niños y adolescentes y hasta la fecha se han desarrollado distintos tipos de dietas, las cuales difieren en su composición de ácidos grasos libres (Brito-Sampaio, 2014).

Por otra parte, otro tipo de dieta que también se basa en la producción de cuerpos cetónicos ( $\beta$ -hidroxibutirato (BHB), acetoacetato, y acetona, Figura 3), característica fundamental de la DC (Rho, 2015), es la restricción calórica (RC). Este tipo de dieta implica la restricción de la ingesta de una dieta nutritiva (Fontana et al., 2010; Chung et al., 2013). Cabe señalar que el ayuno "tradicional" es distinto de la RC, en la que la ingesta diaria de calorías se reduce crónicamente de un 20% a un 40%, pero se mantiene la frecuencia de comidas (Longo y Mattson, 2014).

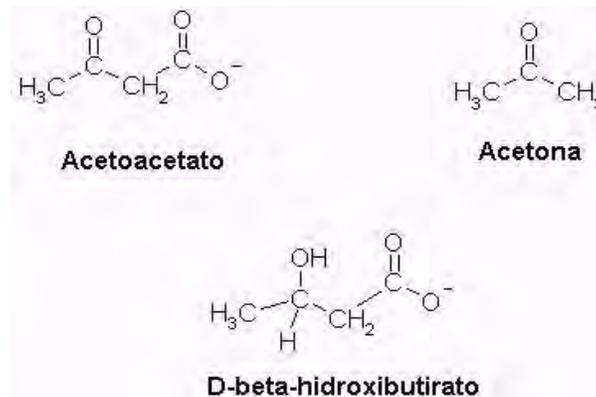


Figura 3. Esquema representando los principales cuerpos cetónicos. Los cuerpos cetónicos son moléculas derivadas del metabolismo de los lípidos, los cuales sirven como una fuente de energía que circula por los tejidos en los tiempos de ayuno o ejercicio prolongado. Se producen en el hígado a partir de ácidos grasos y se distribuyen a través de la circulación sanguínea a los tejidos metabólicamente activos, tales como el músculo o el cerebro, donde se utiliza como combustible alternativo a la glucosa.

A pesar del uso en todo el mundo de la DC y de una comprensión cada vez mayor de los mecanismos que le subyace, aún no se han desarrollado protocolos internacionales de edad, indicaciones y contraindicaciones, iniciación y la duración de la dieta, así como los medicamentos anticonvulsivos con la que puede ir acompañada (Freeman et al., 2006).

La dieta cetogénica tiene varios efectos adversos que enseguida se enlistan.

Efectos adversos dieta cetogénica a corto y largo plazo:

- Efectos gastrointestinales (náuseas, vómitos, pérdida de apetito, estreñimiento)
- Deshidratación
- Sepsis
- Miocardiopatía
- Pancreatitis

- Alteraciones bioquímicas (hipoglucemia, hipertrigliceridemia, hiperuricemia, hipertransaminemia, hipercolesterolemia, hipoproteinemia, hipomagnesemia, hiponatremia, acidosis metabólica, dislipidemias)
- Retraso en el crecimiento
- Insuficiencia hepática
- Reflujo gastroesofágico
- Deficiencias de minerales
- Deficiencias de vitaminas
- Urolitiasis
- Osteopenia
- Anemia

(Modificado de Freeman et al., 2006).

Como se puede apreciar, la DC constituye un tratamiento con graves efectos adversos y muchas veces, con dificultades en su aplicación y cumplimiento, ya que los pacientes con la DC requieren un estricto seguimiento y la supervisión constante por un equipo médico altamente experimentado con el fin de prevenir complicaciones (Vaccarezza y Silva, 2015).

En la actualidad, es muy importante seguir en la búsqueda de nuevas alternativas para aquellos pacientes que aún se encuentran en la lucha constante contra este padecimiento, ya que como se mencionó con anterioridad, a pesar de todos los FAE disponibles, se estima que cerca de un tercio o más de los pacientes con epilepsia no logran obtener un control adecuado de sus crisis con el tratamiento de fármacos convencionales. Esto los lleva a tener una mala calidad de vida ya que un mal control se asocia a la ocurrencia de accidentes, lesiones físicas, trastornos psiquiátricos, deterioro cognitivo progresivo, estigma y exclusión social.

Se sabe que cuando una persona está en ayuno, el cerebro usa los cuerpos cetónicos como el BHB por falta de glucosa que es su principal combustible. Esto permite la sobrevivencia por largos períodos de inanición, ya que el BHB es un portador de energía en tiempos de ayuno o ejercicio prolongado (Newman y Verdin, 2014). Pero lo más importante, es que ha permitido al cerebro convertirse

en el componente más significativo en la evolución humana (Cahill, 2006). En los seres humanos, el ayuno se consigue ingiriendo mínimos o nulas cantidades de alimentos y bebidas calóricas por períodos que generalmente van desde 12 horas hasta 3 semanas y muchos grupos religiosos incorporan períodos de ayuno en sus cultos.

#### 3.4.2 Restricción alimentaria (RA)

Otro tipo de dieta que se ha estudiado recientemente para controlar las crisis en modelos farmacológicos, es la restricción alimentaria (RA), la cual es un desafío nutricional en el que se limita la disponibilidad de alimentos por un breve momento en distintos periodos de tiempo durante la fase activa de los organismos (Bellet y Sassone-Corsi, 2010). Este modelo restrictivo que consiste en ayunos intermedios, es capaz de producir un efecto anticonvulsivante induciendo diversos cambios en la regulación del metabolismo energético y en cambios epigenéticos (Landgrave-Gómez et al., 2016).

El resultado del ayuno intermedio es la producción de cuerpos cetónicos o cetogénesis y ésta a su vez, promueve cambios en las vías metabólicas y procesos celulares tales como la resistencia al estrés, la lipólisis y la autofagia, por lo cual puede llevar a tener aplicaciones médicas, como la disminución de las crisis convulsivas asociada con daño cerebral y la mejora de la artritis reumatoide (Longo y Mattson, 2014). Asimismo, se ha visto en estudios realizados con monos *Rhesus*, que el ayuno tiene efectos de salud benéficos en morbilidad y mortalidad, ya que la dieta puede tener un efecto positivo en prolongar la vida en estos primates (Mattison et al., 2012).

En la actualidad, existen estudios que han sido diseñados para poder investigar los efectos del BHB sobre ataques inducidos por pilocarpina. De manera reciente se ha sugerido que los cuerpos cetónicos, en especial BHB, puede tener actividad anticonvulsiva directa en ratones jóvenes (Yum et al., 2012).

Dado lo anterior, terapias basadas en el metabolismo como la dieta cetogénica han mostrado ser efectivas en el tratamiento de los pacientes fármacorresistentes. Desafortunadamente, el uso clínico de este tipo de dieta es muy controversial

debido al gran número de efectos adversos que puede provocar. Sin embargo, trabajos previos realizados en el laboratorio han demostrado que la restricción alimentaria es capaz de ejercer un efecto anticonvulsivo en un modelo de SE. En este sentido, se necesitan realizar estudios que expliquen los posibles mecanismos de la restricción alimentaria para ejercer los efectos benéficos anteriormente descritos (como por ejemplo, una acción antioxidante).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La epilepsia es una enfermedad neurológica crónica, caracterizada por convulsiones recurrentes que afecta a personas de todo el mundo. Dicha enfermedad afecta aproximadamente a 70 millones (1%-2%) de personas de la población mundial, lo que convierte a esta enfermedad en la causa neurológica de defunción más común (OMS, 2016). Asimismo, se estima que aproximadamente el 30% de los pacientes epilépticos son fármacorresistentes y por tanto, su calidad de vida se ve desfavorecida así como es afectada la integración del paciente dentro de la sociedad. De aquí surge la necesidad de descubrir tratamientos distintos a los fármacos antiepilépticos convencionales (McNally y Hartman, 2012). En este sentido, es muy importante el estudio de nuevas alternativas terapéuticas como dietas restrictivas (restricción alimentaria) que permitan disminuir el daño generado por la propia enfermedad.

Por otra parte, es conocido que en el estado epiléptico (SE), la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se ve aumentada, por lo cual parece tener un papel importante en el daño a las neuronas (Dal-Pizzol et al., 2000).

Dado lo anterior, sería importante investigar si el modelo de restricción alimentaria podría tener un efecto antioxidante posterior a la inducción del SE y de ser así, se pudiese proponer como un co-tratamiento alternativo para evitar el daño neuronal producido por las convulsiones mediadas por las ROS.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 General:

Analizar el efecto antioxidante de un modelo de Restricción Alimentaria en hipocampo de ratas con estado epiléptico inducido por pilocarpina a través de un curso temporal agudo.

### 5.2 Específicos:

- Medir parámetros físicos (peso corporal) y parámetros bioquímicos (niveles de glucosa y  $\beta$ -hidroxibutirato) en sangre cada 5 días durante el modelo de restricción alimentaria.
- Cuantificar un producto de lipoperoxidación (malondialdehído) en tejido de hipocampo a través de un curso temporal (3, 8 y 24 h) posterior al SE.
- Determinar mediante la fluorescencia del dihidroetidio, la presencia del radical superóxido en cortes de cerebro (hipocampo) 24 h posteriores al SE.

## **6. HIPÓTESIS**

Si durante el estado epiléptico (SE) se genera un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) entonces la restricción alimentaria producirá una disminución en los niveles de ROS en el hipocampo de la rata posteriormente a un SE.

## 7. METODOLOGÍA

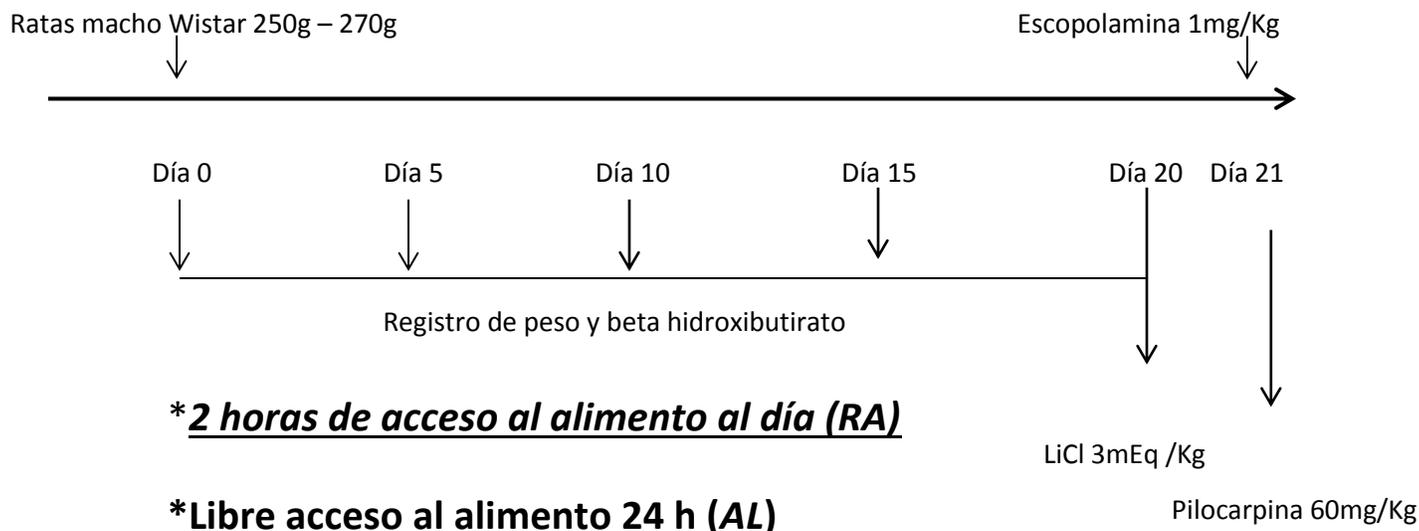
### 7.1 Modelo de Restricción Alimentaria

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, con un peso aproximado de 250-270 g, dividiéndose aleatoriamente en cuatro grupos: 1) Ad Libitum (AL); 2) Ad Libitum con Pilocarpina (AL-P); 3) Restricción Alimentaria (RA); y, 4) Restricción Alimentaria con Pilocarpina (RA-P). (n=6 por grupo).

A los grupos AL se les permitió el libre acceso a comida y agua mientras que el modelo de RA, el acceso al alimento fue durante dos horas y, posteriormente a ese tiempo, se les retiró hasta el siguiente día (22 h de ayuno); el agua fue de libre acceso. Todos los animales fueron mantenidos en el bioterio bajo condiciones de luz y temperatura controladas.

Cabe mencionar que el empleo de animales de experimentación fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

### “Modelo de restricción alimentaria”



## 7.2 Medición del peso corporal, glucosa y $\beta$ -hidroxibutirato

A los días 0, 5, 10, 15 y 20 se registró el peso corporal de los animales y se cuantificó el nivel de glucosa y de  $\beta$ -hidroxibutirato mediante el glucómetro Optium Xceed (Abbott USA) por medio de tiras reactivas específicas.

## 7.3 Modelo agudo de crisis epilépticas

Se realizó empleando litio-pilocarpina en ratas macho de la cepa Wistar con un peso promedio al día 20 de 332.83 g para las ratas AL y de 260.33 g para las ratas RA. A los animales se les administró una inyección intraperitoneal (ip) de cloruro de litio (3 mEq/Kg) al día 20; y, de 18 a 20 h después de dicho tratamiento, se les administró por vía subcutánea (s.c.) una inyección de metil nitrato de (-) escopolamina (1 mg/Kg) disuelta en solución salina. Transcurridos 30 min, los animales de los grupos AL-P y RA-P recibieron una inyección de pilocarpina (60 mg/Kg, s.c.). Para el caso de los grupos control (AL y RA), los animales recibieron las inyecciones de LiCl y escopolamina pero omitiendo la inyección de pilocarpina y solo administrando una inyección de solución salina (vehículo).

Se observaron las etapas de la escala de Racine, la cual evalúa la severidad de las convulsiones manifestándose con cambios conductuales hasta la aparición del SE. Dichos cambios observados fueron acinesia, piloerección, temblor (etapa 1); salivación, movimientos de cabeza (etapa 2); clonus unilaterales o bilaterales de miembros anteriores (etapa 3); posición de canguro con o sin pérdida de la postura corporal (etapa 4); y, crisis límbicas repetidas y SE (etapa 5). De manera representativa, en la figura 4 se observa una rata en la etapa 4, la cual ha perdido la postura corporal y presenta movimientos involuntarios de cabeza. A los animales se les dejó 90 min en SE y pasado ese tiempo, se les administró una solución de benzodiazepinas (Diazepam, 5 mg/kg) intramuscular (i.m.) para detener el SE. Posteriormente, los animales se mantuvieron en una habitación a 18 °C y se sacrificaron a las 3, 8 y 24 h posterior al SE mediante una sobredosis de anestésico (pentobarbital sódico). Una vez sacrificados los animales, se disecó el cerebro lo más pronto posible para poder obtener la región del hipocampo. El tejido hipocampal se almacenó en un ultracongelador a -70°C hasta su utilización.



Figura 4. Rata macho de la cepa Wistar en SE. Se ejemplifica el SE inducido con Lítio-Pilocarpina donde se pueden observar postura involuntaria de las patas delanteras.

#### 7.4 Cuantificación de malondialdehído (MDA)

El tejido hipocampal se homogenizó en 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS, pH= 7.4) con 10  $\mu$ L de hidroxitolueno butilado (0.5 M) en acetonitrilo.

Para la realización de la curva estándar se utilizó tetrametoxipropano (TMPO) a diferentes concentraciones. Ver anexo. En tubos de ensayo de vidrio se mezcló con los siguientes reactivos:

	Blanco	Estándares	Muestra
A. Fosfatos pH 7.4	0.2 mL	---	---
Muestra	---	---	0.2 MI
Estándares de MDA	---	0.2 mL	---
Sol. 1 M2F 15.4 mM	0.65 mL	0.65 mL	0.65 mL
HCl concentrado	0.15 mL	0.15 mL	0.15 mL

La mezcla se incubó a 50°C por una hora, posteriormente se centrifugó a 3,000 g por 5 min y enseguida se leyó la absorbancia a 586 nm de los sobrenadantes y de la curva estándar en un espectrofotómetro. Ver anexo.

### 7.5 Cuantificación de proteínas por el método de ácido bicinconínico

Se cuantificó la concentración de proteínas de cada muestra por el método del ácido bicinconínico (BCA). Método altamente sensible donde el BCA, en forma de su sal de sodio soluble en agua, es un reactivo altamente sensible y específico que es capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones  $\text{Cu}^{1+}$  en un medio alcalino que puede ser leído a 562 nm (Ver anexo).

### 7.6 Determinación del radical superóxido en hipocampo

Otro grupo de animales se sacrificó por sobredosis de pentobarbital y el cerebro fue disecado rápidamente y congelado con butanol  $-70^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se realizaron cortes coronales en criostato y se obtuvieron secciones de  $40\ \mu\text{m}$  en portaobjetos con poli-L-lisina. Las laminillas se incubaron con una solución de DHE ( $10\ \mu\text{M}$ ) a temperatura ambiente durante 30 min protegiéndose de la luz. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los cortes fueron observados mediante microscopio de epifluorescencia a un objetivo 10x con el filtro de rodamina. Se tomaron fotografías de los cortes y se analizó la densidad óptica relativa (DOR) de las imágenes mediante el programa de imágenes MCID (InterFocus Imaging Ltd., Cambridge UK).

### 7.7 Análisis estadístico

Los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. Para el análisis estadístico se realizó ANOVA con una prueba posthoc de Tukey de comparación múltiple utilizando el software GraphPad Prism (versión 5.0) y se tomó una significancia con una  $P < 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Influencia de la restricción alimentaria sobre el peso corporal

Para verificar si la restricción alimentaria podría tener un efecto en el peso corporal, se registró el peso de los grupos durante el tratamiento (ver método). El peso corporal promedio de las ratas AL y con RA desde el inicio del tratamiento hasta el final de éste, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Muestra el peso corporal del grupo de animales que tuvieron libre acceso al alimento (AL) y con restricción alimentaria (RA) (n=12 por grupo).

Día /Grupo	Peso Corporal	
	<i>Ad libitum</i> gramos	Restricción alimentaria gramos
0	257.2 g	261.5 g
5	268.0 g	250.4 g
10	287.2 g	242.0 g
15	305.5 g	251.0 g
20	332.8 g	260.3 g

A cada grupo se le midió su peso desde el día inicial (día 0) y cada 5 días hasta el día 20, que fue el periodo de tiempo que duró el modelo de RA. En el día inicial, ambos grupos iniciaron con un peso similar sin presentar diferencia significativa entre sí. Esto se logró gracias a que se seleccionaron los animales al azar con un peso entre el rango aproximado de 250-260 gramos. Para el día 5, los animales sometidos a RA redujeron significativamente su peso corporal. Siguiendo con esta tendencia, para el día diez se observó que los animales sometidos con RA tienen un peso promedio menor respecto al control; lo mismo sucede para el día 15. Para el día 20, los animales sometidos a RA recuperan su peso inicial; sin embargo, el peso corporal es aún mucho menor si es comparado con el del grupo control. Este último resultado se puede deber a que los animales se habitúan y empiezan a recuperar su peso inicial pero sin igualar al grupo AL (Figura 5).

## Cambio de Peso Corporal

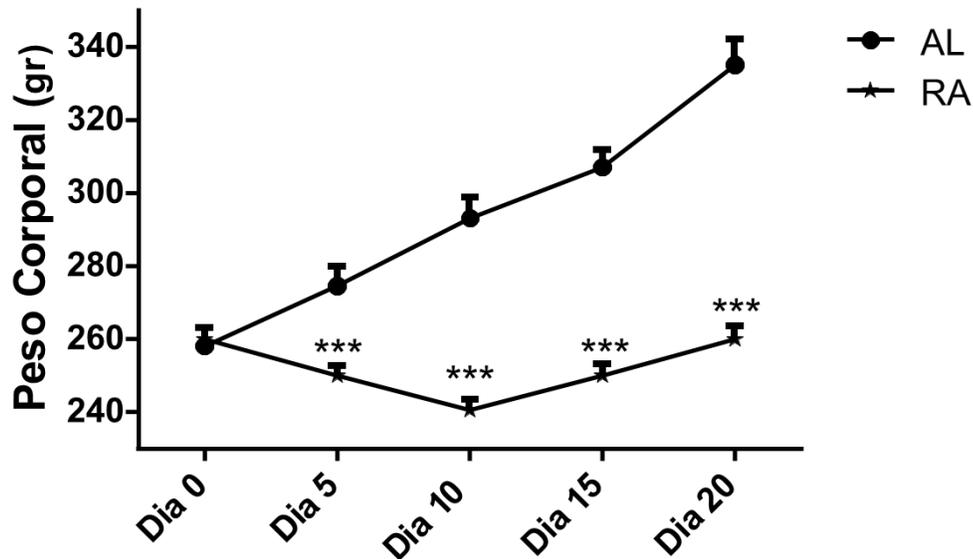


Figura 5: Efecto del tratamiento con restricción alimentaria en el peso corporal en ratas Wistar. En el día 0, se inició el tratamiento. A partir de los días 5, 10 y 20, los pesos corporales en el grupo AL fueron significativamente superiores al del grupo tratado con RA. Los valores se muestran en promedio  $\pm$  Error Estándar medio ( $n = 12$  ratas / grupo). (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

### 8.2 Influencia de la restricción alimentaria sobre la concentración de glucosa y $\beta$ -hidroxibutirato en sangre

Para comprobar que la RA pudiera tener un efecto en los niveles de glucosa y de cuerpos cetónicos, en especial del beta hidroxibutirato (BHB), se procedió a medir sus respectivos niveles en sangre por medio de tiras reactivas. Nuestros resultados mostraron un aumento en los niveles de BHB en los días 5, 10, 15 y 20 en las ratas sometidas con RA respecto a las del grupo control (Figura 6A).

De manera interesante, en las mediciones de los niveles de glucosa en sangre no se observaron cambios significativos en los grupos RA comparado con sus controles (Figura 6B).

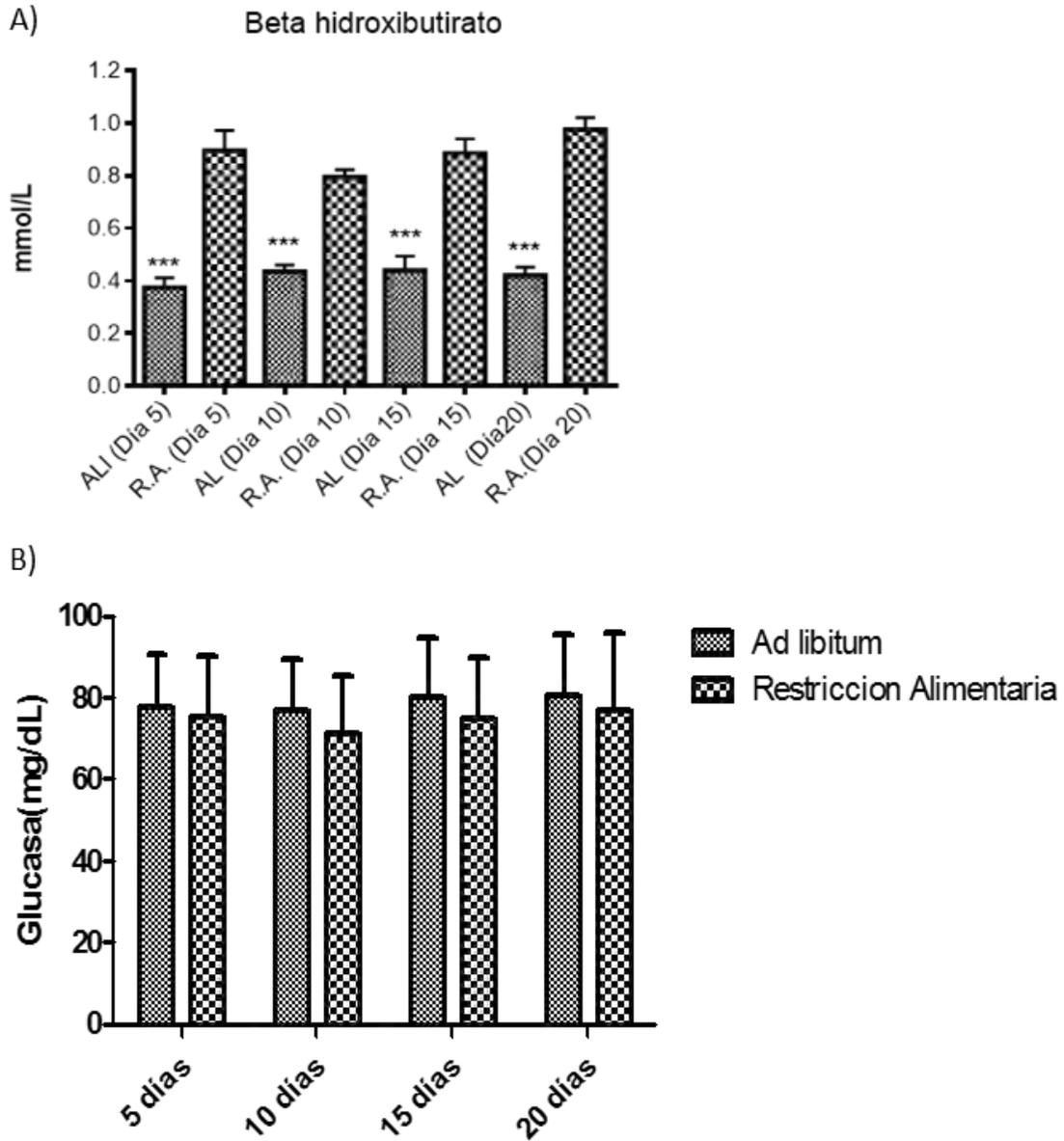


Figura 6: Influencia del tratamiento con restricción alimentaria sobre los niveles de beta hidroxibutirato y glucosa en sangre. Los niveles de BHB (A) se encuentran elevados significativamente en el grupo RA a lo largo del tratamiento, mientras que los niveles de glucosa (B) no presentan cambios significativos entre ambos grupos. Los valores se presentan como promedio  $\pm$  error estándar medio ( $n = 12$  ratas / grupo). (\*\*\*)  $P < 0.001$ .

### 8.3 Efecto anticonvulsivo de la restricción alimentaria

Para estudiar los efectos de la restricción alimentaria en la severidad de las crisis, se utilizó como parámetro de cuantificación la escala de Racine (Racine, 1972), la cual es una herramienta conductual muy útil ya que se categorizan seis etapas de intensidad para modelos experimentales de ELT. En las primeras etapas se pueden observar la acinesia y piloerección de los animales, movimientos masticatorios y salivación. En etapas intermedias, se observan movimientos mioclónicos unilaterales o bilaterales, en algunas ocasiones se observa la conducta de “sacudidas de perro mojado” o posición de canguro con o sin pérdida de postura y en última etapa se presenta la muerte del animal. Como se observa en la Figura 7, se registró una disminución significativa de las etapas de Racine de las ratas tratadas en restricción alimentaria en comparación con los animales alimentados *ad libitum*. (Promedio  $\pm$  error estándar).

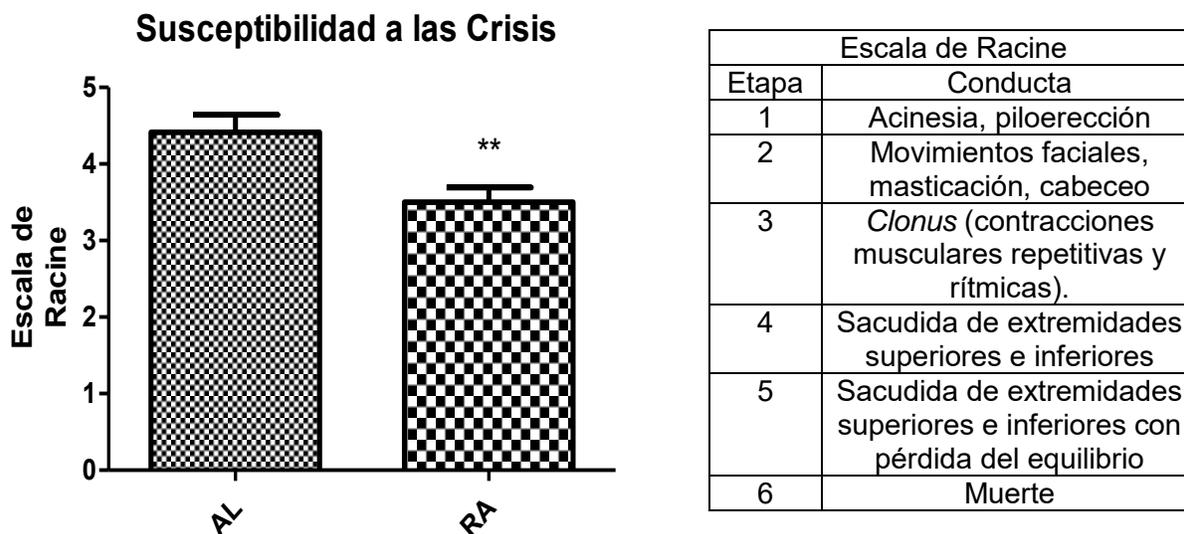


Figura 7. Efecto de la restricción alimentaria en la escala Racine. Ratas sometidas a la dieta restrictiva (n=12) y grupos alimentados *Ad libitum* (n=12) fueron videograbadas posteriormente a la inyección con pilocarpina. Etapa 0 significa “no movimientos tónicos clónicos característicos del SE”, mientras que etapa 5 significa “coleteo con convulsiones generalizadas”. Los valores se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. (\*\*  $P < 0.01$ ).

#### 8.4 Contenido de malondialdehído en el hipocampo

La peroxidación lipídica es una oxidación en cadena de los lípidos de las membranas celulares con radicales libres especialmente de especies reactivas de oxígeno, lo que resulta en la formación de varios compuestos activos que ocasionan daño celular. Uno de estos compuestos es el malondialdehído (MDA) que es un subproducto de la lipoperoxidación ampliamente utilizado como para evaluar el estrés oxidante. En la Figura 8A, se observó la concentración de MDA, a las tres horas posterior al estado epiléptico y se apreció un incremento significativo entre el grupo control (AL) y el grupo AL con estado epiléptico (AL-P), corroborando a su vez el dato obtenido con resultados de otros grupos de investigación donde el MDA aumenta a las dos horas posteriores a la inducción del SE en la corteza e hipocampo (Tejada et al., 2007).

De manera interesante, en los animales que llevaron a cabo la restricción alimentaria (grupo RA) se observó un ligero aumento en los niveles de MDA sin ser significativo. Por otra parte, en los animales que fueron sometidos a RA y que se les indujo el estado epiléptico (RA-P), se observó una disminución de los niveles de MDA en comparación con la de los animales AL y AL-P; no obstante, esta disminución en los niveles de MDA no es significativa (Figura 8A). Asimismo, un comportamiento similar se observó en los animales que fueron sacrificados en el tiempo de ocho horas (Figura 8B).

Con respecto a los resultados del tiempo de 24 h, éstos fueron parecidos a los dos anteriores tiempos (3 y 8 h), donde se puede observar un ligero incremento entre el grupo control RA en comparación con el grupo AL; y, de igual forma, no hubo diferencia significativa entre ambos grupos. Además, se observó un incremento significativo entre el grupo AL-P comparado con el grupo control AL. En el caso del grupo RA-P, se observó una reducción de los niveles de MDA estadísticamente significativa en comparación con la del grupo AL-P, por lo cual se sugiere un efecto antioxidante de la RA en el tiempo de 24 h posterior al estado epiléptico.

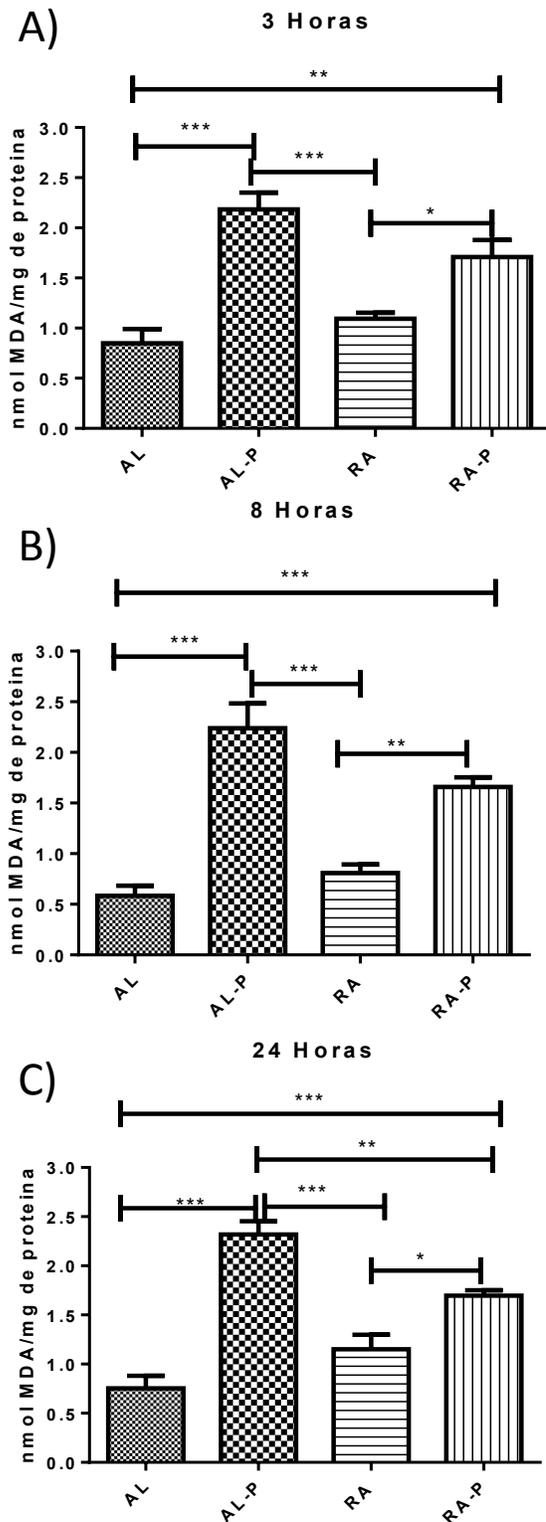


Figura 8: Análisis del contenido de MDA en la región de hipocampo en los grupos de ratas *Ad libitum* y con restricción alimentaria a 3 h A), 8 h B) y de 24 h C) posterior al SE. Como se observa en las gráficas, existe un incremento significativo en el grupo AL-P comparado con el del grupo control AL. De manera interesante, en el grupo RA *per se*, se observa un ligero incremento de MDA comparado con el del control AL. Por otro lado, el grupo de RA-P mostró una disminución en los niveles de MDA comparado con el del grupo AL-P pero solo fue significativo en el tiempo de 24 h. Estos resultados sugieren un efecto antioxidante de la RA (n=6 por grupo). Todos los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar (\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

## 8.5 Determinación del radical superóxido en hipocampo

La detección de superóxido por dihidroetidio (DHE) que es una prueba muy común utilizada para la detección del radical anión superóxido y su medición es de suma importancia ya que este radical es generado a partir de las mitocondrias y es la forma más abundante de especies reactivas de oxígeno en las neuronas.

Para la detección de superóxido en cortes coronales de hipocampo, se utilizó la fluorescencia que deriva de la oxidación de dihidroetidio, que es ampliamente utilizado para evaluar el estrés oxidante. En la Figura 9, se observan las regiones del hipocampo tales como CA3 (1), CA1 (2) y GD (3) de ratas AL control (A), ratas AL más la inyección de pilocarpina (B), ratas sometidas a RA (C) y animales sometidos a RA más inyección con pilocarpina (D) 24 h posterior al SE. Dicho tiempo fue escogido debido a que en este punto se encontraron diferencias significativas en los niveles de MDA en animales RA-P comparado con las del grupo AL-P.

Los niveles de superóxido entre el grupo control RA en comparación con los del grupo control AL, no fueron significativamente diferentes (Figura 9, incisos 1, 2 y 3 C comparado con A). Por otra parte, se observó un incremento significativo entre el grupo AL con estado epiléptico (AL-P) comparado con el del grupo control AL, corroborando los resultados anteriores con las mediciones de MDA y con lo reportado por otros grupos de investigación (Pestana et al., 2010).

Para el caso de los animales con restricción alimentaria inducidos con estado epiléptico (RA-P), existe una disminución que es significativa en la densidad óptica a las 24 h post SE en las regiones de hipocampo estudiadas CA3, CA1 y GD (Figura 9, inciso 1 2 y 3 D), comparada con la de los animales AL inducidos con SE (Figura 9, inciso 1 2 y 3 B). Estos resultados sugieren un efecto antioxidante de la RA en el tiempo de 24 h posterior al estado epiléptico corroborando estos resultados con los ya obtenidos anteriormente por las mediciones de MDA a las 24 h post SE.

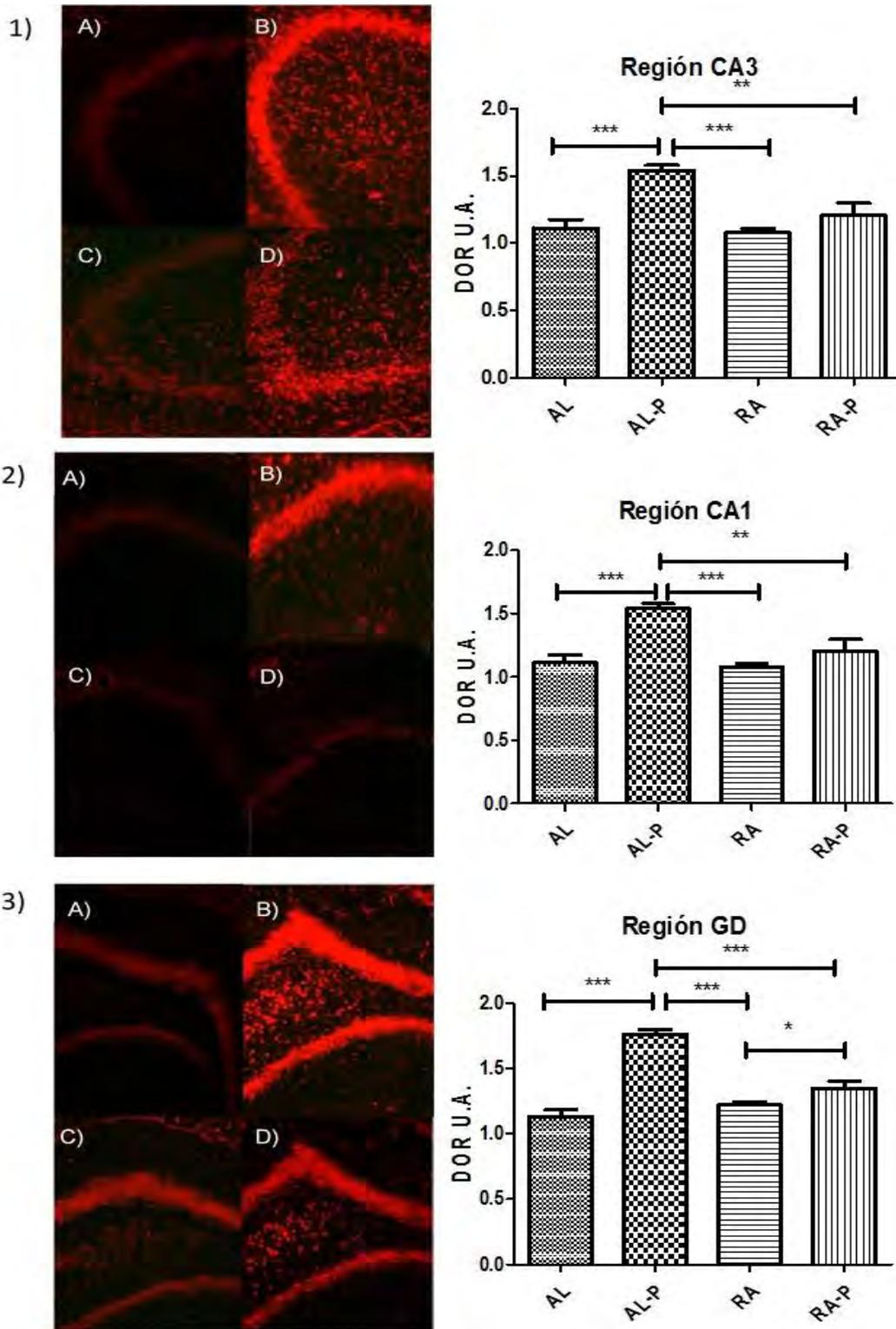


Figura 9: Fotomicrográficas de las regiones CA3 (1), CA1 (2) y GD (3): A) *Ad libitum*, B) *Ad libitum* post SE, C) Restricción Alimentaria, D) Restricción Alimentaria post SE. Puede apreciarse en los gráficos que en las regiones medidas por densidad óptica relativa (CA3, CA1 Y GD) existen diferencias significativas entre los grupos AL-P y RA-P. Todos los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar, \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## 9. DISCUSIÓN

La epilepsia es una patología neurológica que afecta a todas las edades, sexos, razas y estratos socioeconómicos. Este padecimiento representa un problema de salud muy importante el cual afecta severamente la calidad de vida del paciente que lo padece.

Por otra parte, la epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es el tipo de epilepsia más frecuente y aunque existe una gran variedad de fármacos antiepilépticos que se han desarrollado en los últimos años, éstos siguen siendo incapaces de controlar las convulsiones en aproximadamente el 30% de los pacientes con ELT (McNally y Hartman, 2013).

En este sentido, el uso de modelos animales que mimeticen la epilepsia resulta importante para un mejor conocimiento de la fisiopatología de dicho padecimiento. Por ello, en este trabajo se empleó el modelo de inducción de *status epilepticus* (SE) con litio-pilocarpina, del cual se han reportado características histológicas y fisiológicas similares a la ELT de humano, lo que ayuda a comprender los mecanismos que permiten que un cerebro normal se convierta en epiléptico (Lemos y Cavalheiro, 1995).

Existen avances en el diagnóstico y tratamiento de la epilepsia en niños y adultos, sin embargo, aún existen pacientes con crisis no controladas y que tienen opciones limitadas para el tratamiento, por lo cual, se deben considerar terapias alternativas distintas a los fármacos antiepilépticos, como lo son las dietas basadas metabolismo (McNally y Hartman, 2012). Las terapias no farmacológicas, como la dieta cetogénica, la restricción calórica y la restricción alimentaria, se han explorado como una alternativa para disminuir las convulsiones teniendo como objetivo la bioenergética mitocondrial y el metabolismo (Patel, 2006; Landgrave-Gómez et al., 2016). Éstas se basan en la producción de cuerpos cetónicos ( $\beta$ -hidroxibutirato, acetoacetato y acetona) ya que estos son la característica fundamental de las dietas restrictivas (Rho, 2015).

La glucosa es la principal fuente de energía en el cerebro, no obstante durante el ayuno prolongado, ésta disminuye y es cuando el cerebro utiliza otras fuentes de energía, tales como cuerpos cetónicos (Noh et al., 2006). A este respecto, nuestros resultados demuestran que en el grupo restricción alimentaria (RA) no existe una disminución significativa en los niveles de glucosa con respecto a la del grupo AL a pesar del ayuno intermedio en que están sometidas los animales.

Por otra parte, se observó un incremento en los niveles de BHB en los grupos que se sometieron a la RA respecto al grupo AL a lo largo de todo el tratamiento con dicha dieta. Los cuerpos cetónicos se producen en las mitocondrias de las células del hígado a partir de ácidos grasos por el proceso conocido como cetogénesis, donde los ácidos grasos se transforman a dos cuerpos cetónicos principales que son acetoacetato y BHB, mientras que la acetona es el tercer metabolito; sin embargo, es el menos abundante. Sus niveles aumentan durante el ayuno, el ejercicio prolongado, o dietas ricas en grasas distribuyéndose a través de la circulación a los tejidos activos metabólicamente, tales como el músculo o el cerebro, donde se utilizan como fuente de energía cuando la glucosa no está disponible (Laffel, 1999; Rho, 2015). En los resultados obtenidos, se puede apreciar que las ratas alimentadas *ad libitum* (AL), los niveles BHB se mantienen por debajo de 0.5 mM, lo cual ha sido reportado en la literatura como el nivel normal de cuerpos cetónicos (Sokoloff, 1973). Sin embargo, durante el ayuno o una dieta baja en proteínas, carbohidratos y rica en ácidos grasos como lo es la DC, los niveles sanguíneos de los cuerpos cetónicos se elevan, como se ve reflejado en las ratas tratadas con RA, debido a que estos cuerpos cetónicos se producen para usarse como sustrato energético (Noh et al., 2006)

Se sabe que la acumulación de BHB en sangre aumenta de 1 a 2 mM durante el ayuno cuando el hígado cambia a la oxidación de ácidos grasos, e incluso las concentraciones más altas durante el ayuno prolongado (6 a 8 mM) (Cahill, 2006) y en la cetosis diabética (> 25 mM) (Laffel, 1999). Los niveles que se obtuvieron de BHB en las ratas tratadas con RA son en promedio 0.7 mM, lo cual puede ser un indicador que las ratas con RA sufren una cetosis moderada ya que como se

mencionó con anterioridad, es el principal y efecto grave adverso que se presenta en la DC. Sin embargo, no se podría asegurar si en nuestro modelo de restricción puede tener efectos secundarios a largo plazo por lo cual, se necesitaría realizar más experimentos para descartar efectos adversos. Asimismo, existen reportes que sugirieren que, durante el ayuno o la administración de cuerpos cetónicos, éstos ejercen un efecto neuroprotector en modelos de hipoxia, enfermedad de Alzheimer y de Parkinson (Kashiwaya et al., 2000; Masuda et al., 2005). En el caso de la enfermedad de Alzheimer, la neuroprotección se observa en la región de hipocampo contra la del estrés oxidante y la apoptosis (Xie et al., 2015).

Consistentemente con estas observaciones, se ha reportado anteriormente que las dietas con un alto contenido de grasa y bajo en carbohidratos, como lo es la DC, protege contra la muerte celular (apoptosis) mediada por la proteína caspasa 3 en el hipocampo de ratones (Noh et al., 2003; Noh et al., 2006).

Por otra parte, estudios previos han demostrado que el estrés oxidante es uno de los procesos patofisiológicos que se encuentran involucrados en el SE y en la epilepsia (Patel y Waldbaum, 2010). La peroxidación de lípidos que puede ser determinada por la cuantificación de malondialdehído (MDA), es un biomarcador útil para poder medir estrés oxidante. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se basan en la cuantificación de MDA, los cuales indican que a los tiempos estudiados (3, 8 y 24 h post SE), existe una diferencia mayor significativa en la concentración de MDA en los grupos AL-P en comparación con la del AL. Estos resultados concuerdan con los reportados anteriormente en la literatura en la cual desde las dos horas posteriores de haber inducido el SE, se ven aumentados los niveles de MDA en la corteza e hipocampo (Tejada et al., 2007). De manera interesante, en los grupos con control RA existe un leve incremento de la concentración de MDA; no obstante, éste no fue significativo. Para el caso del grupo de RA-P, se observó menores niveles de MDA en todos los tiempos estudiados; sin embargo, fue en el tiempo de 24 h donde los niveles de MDA son menores de manera significativa en comparación con los del grupo AL-P.

Una posible explicación sobre el aumento de los niveles de MDA en el grupo control de RA sería que la dieta restrictiva *per se* podría ejercer un leve estrés en los animales y en particular en las células nerviosas. Esto resultaría en la activación de las vías de respuesta ante este estímulo por sobrecompensación (un proceso llamado hormesis) y generaría una respuesta adaptativa a los bajos niveles de estrés o daño, resultando en una mayor aptitud para que el sistema fisiológico produzca una compensación a esta interrupción de la homeostasis (Calabrese y Baldwin, 2002.). En este sentido, el estrés leve que pudieran estar sufriendo los animales sometidos a la RA podría ser la señal constante de hambre ya que, como se mencionó en la metodología, las ratas tienen una restricción de alimento (ayuno intermitente) por 22 h y la disponibilidad de nutrientes es limitada, por lo que el sistema refuerza la actividad oxidante y de esta forma aumenta moderadamente los niveles de ROS, lo que a su vez promueve la resistencia al estrés oxidante. Debido a que la escasez de alimentos en el organismo es un factor de estrés fundamental que desencadena cambios directos en las señales relacionadas con la alimentación y la activación inmediata de respuesta al estrés, se ha visto que ratas con privación de alimentos en tiempos agudos (4 h), generan una gran cantidad de cambios metabólicos incluyendo una reducción considerable en el peso corporal y aumento en los niveles de circulación de corticosteroides (Dallman et al., 1999; Bains et al., 2011).

Asimismo, no solo la falta de disponibilidad de alimento podría generar elevación del estrés oxidante, sino que la composición de una dieta también podría elevar estos niveles. En este sentido, Milder et al., (2010), recientemente reportaron que los animales que fueron sometidos a una dieta cetogénica produjeron estrés oxidante a tiempos cortos (1, 3 días) el cual disminuyó, de manera considerable, a la primera y tercera semanas de haber sometido a los animales a la DC, aunado con la activación del factor Nrf2, unos de los factores de transcripción involucrados en respuestas antioxidantes (Milder et al., 2010).

Por otra parte, durante los 20 días que dura el tratamiento con RA, los animales están sometidos a un ayuno intermitente; esto a su vez, produce un contacto

permanente de BHB en el cerebro de rata, ya que este metabolito puede cruzar la barrera hematoencefálica llegando a las neuronas (Thaler et al., 2010). Este mecanismo neuroprotector ha sido propuesto por la restricción calórica y es análogo a los efectos benéficos del ejercicio en las células del músculo y del corazón, en la que existe un aumento en la demanda de energía y de estrés oxidante por lo cual las respuestas al estrés se activan (Maalouf et al., 2009). De hecho, la restricción calórica impone un estrés leve en las células, lo que resulta en la activación de las vías de respuesta al estrés, incluyendo aquellas que implican factores de transcripción, tales como el elemento de unión a respuesta de AMPc (CREB) o el factor relacionado al factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) (Mattson y Cheng, 2006). La inducción de la expresión de numerosos genes de respuesta antioxidante depende de un factor de transcripción clave, el factor Nrf2. Éste participa en la síntesis de enzimas detoxificantes y antioxidantes mediante su translocación al núcleo celular y unión a secuencias específicas de los llamados elementos de respuesta antioxidante (ERA), induciendo expresiones de genes antioxidantes para enzimas tales como, la superóxido dismutasa (SOD), la glutación peroxidasa (GPx) y glutación-S-transferasa (Lv et al., 2015).

Por otra parte, existe evidencia que señala que el BHB es un inhibidor endógeno específico de la histona desacetilasa (HDAC), en específico de la clase I, el cual está correlacionado con cambios globales en la transcripción. Entre éstos se encuentra un aumento en la transcripción de genes que codifican para factores de resistencia al estrés oxidante como el factor de transcripción Forkhead O 3a (FoxO3a) y proteínas que unen cationes o xenobióticos como la metalotioeína 2 (MT2) (Shimazu et al., 2013). Cabe destacar que la subfamilia Forkhead O está integrada por cuatro miembros: FoxO1a, FoxO3a, FoxO4 y FoxO6; mismos que están implicados en la regulación del metabolismo, la proliferación celular, la resistencia al estrés oxidante, la regulación del sistema inmune y la apoptosis (De Keizer et al., 2011).



Por otra parte, existe evidencia genética y farmacológica que indica que la inhibición de la señalización de mTOR, en donde existe una restricción de nutrientes, incluye mejoras a la respuesta al estrés y la longevidad (Vellai et al., 2003; Harrison et al., 2009; Selman et al., 2009.) Así, aunque se requiere la señalización de mTOR para la plasticidad sináptica, un aumento de la actividad de mTOR podría provocar hiperexcitabilidad neuronal y epilepsia (Lasarge et al., 2014): ambos fenómenos son se inhiben potencialmente por la restricción calórica (Mattson, 2012).

Se sabe que la autofagia sirve el doble propósito de eliminar los desechos celulares y el reciclaje de productos de degradación, ya sea para el uso de nuevas macromoléculas o como fuente de energía en condiciones de escasez de nutrientes, ya que es conocido que es una estrategia de supervivencia contra el hambre. En este sentido, la autofagia es útil en la eliminación de las mitocondrias dañadas que sobre producen ROS y desencadenan la inflamación (Tschopp, 2011).

Los datos obtenidos en el presente trabajo de tesis donde se aprecia una clara disminución de MDA y superóxido a las 24 h post SE, puede deberse en parte, a que estos posibles mecanismos, bien conocidos en dietas restrictivas, estén actuando en conjunto para dar un posible efecto neuroprotector a nuestras ratas tratadas con RA; no obstante, se necesita realizar más experimentos que confirmen esta hipótesis.

## **10. CONCLUSIÓN**

En los últimos años se ha reportado un incremento en el número de pacientes con ELT que presenta fármaco-resistencia. Dado lo anterior, es de suma importancia investigar nuevas alternativas terapéuticas para aquellos pacientes que no responden al 100% a los tratamientos convencionales por lo que ya no pueden recibir un tratamiento efectivo. Los resultados de esta tesis de licenciatura sugieren un posible papel antioxidante en ratas tratadas con la dieta de restricción alimentaria en la región de hipocampo a través de un curso temporal posterior al SE; sin embargo, al tiempo de 24 h, los niveles de MDA y DHE son significativamente menores en comparación con los del grupo AL-P. Aunque previos resultados de nuestro laboratorio sugieren que esta dieta restrictiva es capaz de ejercer un efecto anticonvulsivo en un modelo de SE, se necesitan realizar más pruebas experimentales tales como determinaciones del metabolismo de la glucosa, la apoptosis, la proliferación celular y la transcripción de genes relacionados con vías antioxidantes para realmente demostrar el posible papel antioxidante de la dieta restrictiva. Todo este conocimiento sentará las bases para que en un futuro dicha dieta pueda ser utilizada como un co-tratamiento para el control de las crisis en los pacientes con ELT resistente a fármacos.

## 11. ANEXO

### Cuantificación de malondialdehído (MDA) por 1-Metil-2-Fenilindol (1M2F) en tejido de hipocampo.

(Tomado de Gérard-Monnier et al., 1998)

El método ampliamente utilizado para el ensayo de la peroxidación lipídica en las muestras biológicas es la determinación de malondialdehído, ya que éste es el más abundante. En la Figura 1, se muestra el principio de este ensayo que es la medición del cromóforo, tras la reacción de MDA con 1-metil-2- fenilindol (1M2F) en condiciones ácidas.

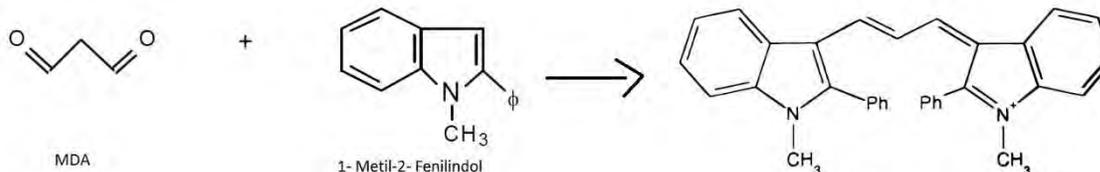


Figura 1. Estructura del cromóforo que se obtiene de la reacción de una molécula de MDA que reacciona con dos moléculas de 1-metil-2-fenilindol en condiciones ácidas. Este cromóforo exhibe máxima absorbanza a 586 nm (Modificado de Gérard-Monnier et al., 1998).

Para la curva estándar se utilizó 1,1,3,3- tetrametoxipropano también conocido como bis-malonaldehído (dimetil acetal) (TMPO), peso molecular 164.20 g/mol , densidad de 0.997 g /ml a 25 °C.

Se preparó una solución stock A, con 10  $\mu$ L de TMPO y 812  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos pH= 7.4, solución con 73.86 mM. Se mezcló en vortex y se guardó en frasco ámbar a 4°C.

Para la preparación del stock B se tomaron 10  $\mu$ L del stock A de TMPO con 9.99 mL de amortiguador de fosfatos pH= 7.4, solución con 73.86  $\mu$ M. Se mezcló en vortex y se guardó en frasco ámbar a 4°C.

Para la curva estándar se utilizó la preparación del stock B de TMPO, en las proporciones siguientes.

Tabla 1. Preparación de curva estándar de MDA

# Estándar	Concentración de MDA ( $\mu\text{M}$ )	nmoles de MDA	stock B (TMPO)	A.de fosfatos pH= 7.4
0	0	0	0 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$
1	2.2158	0.44316	30 $\mu\text{L}$	970 $\mu\text{L}$
2	4.4316	0.88632	60 $\mu\text{L}$	940 $\mu\text{L}$
3	6.6474	1.32948	90 $\mu\text{L}$	910 $\mu\text{L}$
4	8.8632	1.77264	120 $\mu\text{L}$	880 $\mu\text{L}$
5	11.079	2.2158	150 $\mu\text{L}$	850 $\mu\text{L}$
6	22.158	4.4316	300 $\mu\text{L}$	700 $\mu\text{L}$
7	44.316	8.8632	600 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$

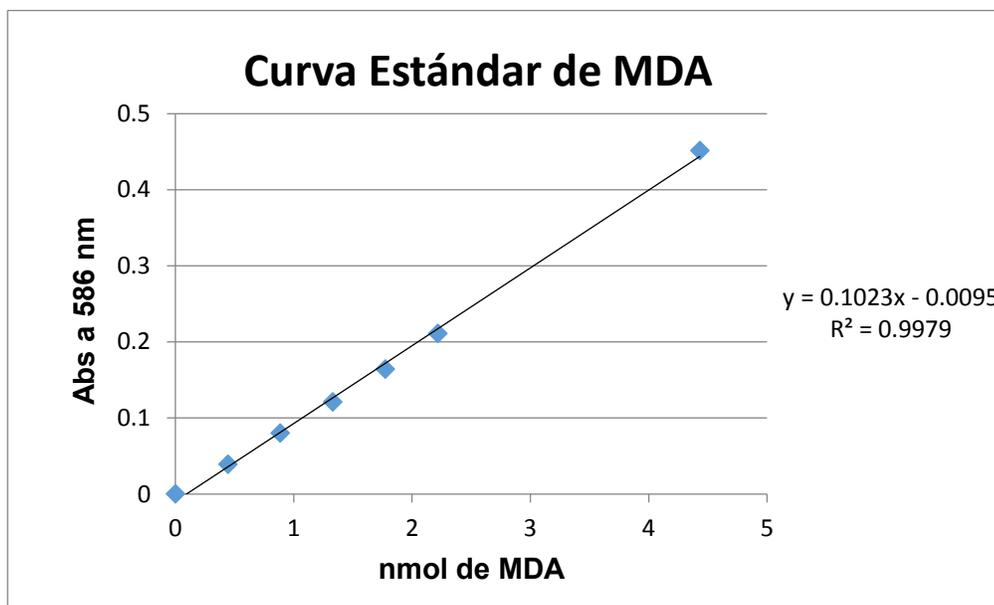
Se tomaron 0.2 mL de cada estándar para la realización de la curva en cada ensayo de MDA.

Ejemplo de cálculos para el estándar #5:

Se tomaron 150  $\mu\text{L}$  del stock B de TMPO (73.86  $\mu\text{M}$ ), más 850  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfatos pH= 7.4, por lo que este estándar tiene 11.079  $\mu\text{M}$

El estándar 11.079  $\mu\text{M}$  tiene entonces 11.079 micromoles en 1000 ml, así que en 0.2 ml (que es lo que se usa en el ensayo de MDA) hay 2.2158 nmoles.

La curva estándar se realizó bajo las mismas condiciones de las muestras problemas donde se incubó a 50°C por una hora y se centrifugó a 3000 g por 5 min; enseguida se leyó la densidad óptica a 586 nm. A continuación se muestra la curva estándar representativa (Gráfica 1):



Gráfica 1: Curva estándar representativa de MDA a una absorbancia de 586 nm.

Ejemplo de cálculos para la obtención de nm de MDA para una muestra:

Se despeja  $x$  de la ecuación obtenida de la curva estándar quedando  $x = (y + 0.0095) / 0.1023$ , con la absorbancia obtenida de cada reacción de las muestras problema leídas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 586 nm y sustituyéndola en la ecuación, se obtuvo la concentración de nuestras muestras problema.

### **Determinación del radical superóxido en el hipocampo mediante dihidroetidio (DHE).**

El DHE es capaz de detectar directamente la producción del radical superóxido, ya que evoca una señal fluorescente de color rojo después de la unión de dihidroetidio a estos radicales libres de oxígeno.

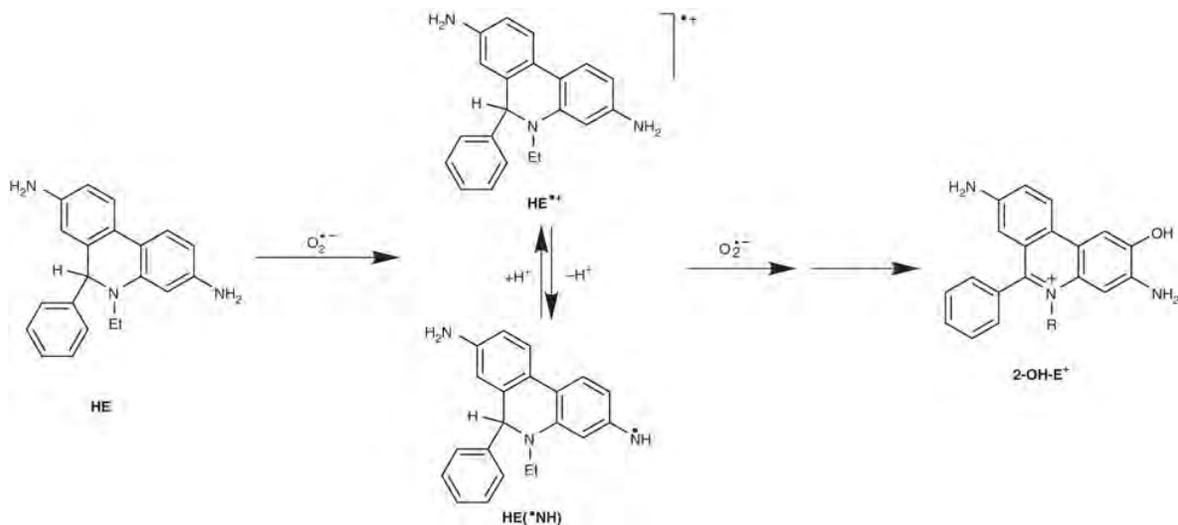


Figura 2. Mecanismo de la formación de 2-hidroxi-etidio entre la reacción de hidroetidina (HE) y  $O_2$  (Modificado de Zielonka et al., 2008).

Una vez que el DHE es oxidado por el superóxido a 2-hidroxi-etidio, se intercala en el ADN y tiñe el núcleo de color rojo fluorescente (Figura 2).

Esta prueba se ha utilizado cada vez más para observar la presencia del ión superóxido en los sistemas biológicos. Debido a que el DHE es un compuesto hidrófobo sin carga que es capaz de atravesar membranas extra e intracelulares, tras la oxidación se carga positivamente y se acumula en las células intercalando en el ADN; principalmente por interacciones electrostáticas con los grupos fosfato de este y adicionalmente a través de interacciones hidrofóbicas (Laurindo et al., 2008)

El protocolo seguido en esta tesis fue modificado de los reportes de Poulet et al, 2006; Zielonka et al., 2008 y Zielonka y Kalyanaraman, 2010.

Se disecó el cerebro de los animales 24 h posteriormente al SE y se congeló en isopropanol frío ( $-70\text{ }^\circ\text{C}$ ). Se obtuvieron secciones de cortes coronales en criostato (Leica CM1850 UV) de  $40\text{ }\mu\text{m}$  de espesor (Figura 3).

Las secciones se colocaron en portaobjetos previamente tratados con solución poli-L-lisina (0.1%, Sigma-Aldrich.) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min con DHE (10 mmol/L) protegidos de la luz. Las imágenes fueron adquiridas como se describió anteriormente.



Figura 3. Corte coronarios con Criostato (Leica CM1850 UV) en secciones de 40  $\mu\text{m}$  de espesor.

### **Cuantificación de proteínas por el método de ácido bicinconínico (BCA).**

La determinación de proteína por BCA es un método altamente sensible donde el ácido bicinconínico, en forma de su sal de sodio soluble en agua, es un reactivo altamente sensible y específico que es capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones  $\text{Cu}^{1+}$  en medio alcalino que puede ser leído a 562nm. Este compuesto forma la base de este método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino (reacción de Biuret).



Tomado de García-Arellano y Vazquez Duhalt, 1998.

Para la cuantificación se utilizó el kit micro BCA Protein de ThermoFisher Scientific, donde el reactivo de BCA se mezcla momentos antes de la reacción en las proporciones siguientes: 25:24:1 de MA: MB: MC, de esta mezcla se toman 100  $\mu\text{L}$ .

La reacción se incubó por 2 h a 37°C y leyó a 562 nm en el espectrofotómetro Epoch marca Biotek.

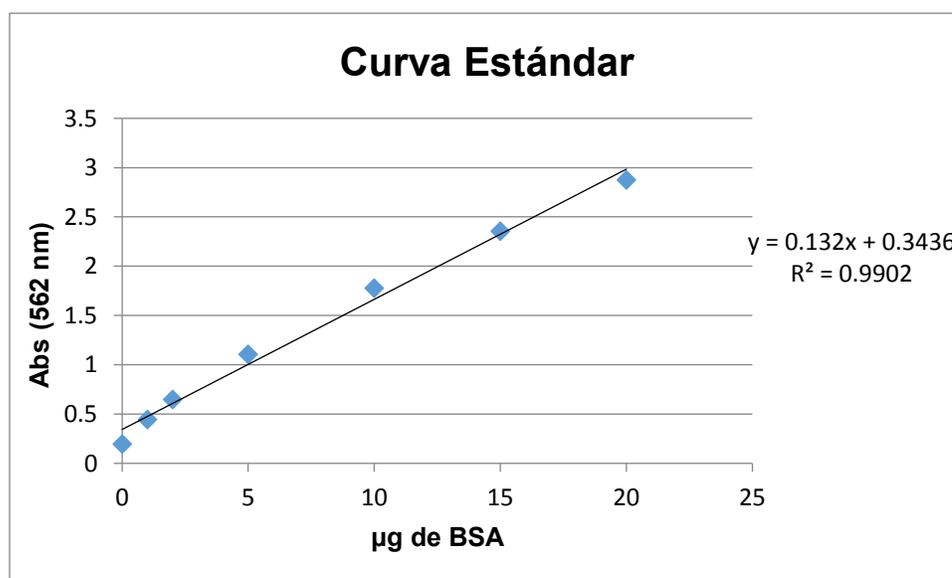
Para la realización de la curva estándar se partió de una solución stock 2 mg/ml de BSA, se tomaron las cantidades como se describe en la Tabla 2.

Tabla 2: Preparación de curva estándar de BCA.

<b>µg BSA</b>	<b>µL BSA</b>	<b>µL BCA</b>	<b>µL de H2O</b>
0	0	100	100
1	0.5	100	99.5
2	1	100	99
5	2.5	100	97.5
10	5	100	95
15	7.5	100	92.5
20	10	100	90

Para las muestras problemas:

<b>µL de Muestra</b>	<b>µL BCA</b>	<b>µL de H2O</b>
1	100	99



Grafica 2: Curva estándar representativa de BCA a una absorbancia de 562 nm.

### Preparación de soluciones:

- 1-metil-2-fenilindol (1M2F) 15.4 mM en acetonitrilo: metanol  
El 1M2F (Sigma- Aldrich), peso molecular 207.27 g/mol se disolvió en proporción 3:1 de acetonitrilo: metanol.

Cantidad a pesar para preparar 80 ml de una solución 15.4mM de 1M2F.

	Peso	Volumen
1M2F	0.25535 g	-
Acetonitrilo	-	60 ml
Metanol	-	30 ml

- Butilhidroxitolueno (BHT) 0.5 M en acetonitrilo.  
El BHT (Sigma- Aldrich), peso molecular 220.35 g/mol

Cantidad a pesar para preparar 1 ml de una solución 0.5 M de BHT.

	Peso	Volumen
BHT	0.1102 g	-
Acetonitrilo	-	1 ml

- Amortiguador de fosfatos pH 7.4.

Cantidad a pesar para preparar 1L de solución de fosfatos a pH 7.4, se ajustó el pH con HCl concentrado. PBS (1x)

	Peso	Volumen (mL)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.41 g	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.25 g	-
NaCl	10 g	-
KCl	0.25 g	-
H <sub>2</sub> O MiliQ		1000

- Dihidroetidio (DHE) 10  $\mu$ M.

DHE Sigma- Aldrich ( $C_{21}H_{21}N_3$ ), peso molecular 315.41 g/mol.

Previamente se preparó una solución stock 1mM donde se pesó 1.57 mg; éste se disolvió en 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO), se tomó una quinta parte (20  $\mu$ L) y se disolvió en 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.4. Ésta solución stock se encuentra a una concentración de 1 mM. De la solución stock 1 mM se tomó 100  $\mu$ L y se llevó a un aforo de 10 mL. Esta solución es 10  $\mu$ M de DHE.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Avello M. y Suwalsky M. (2006). "Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección." *Atenea* (Concepción), (494), 161-172. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010>.
2. Bains JS, Crosby KM, Inoue W, Pittman QJ. (2011). "Endocannabinoids gate state-dependent plasticity of synaptic inhibition in feeding circuits." *Neuron*. 71(3): 529-41.
3. Bedogni B, Pani G, Colavitti R, Riccio A, Borrello S, Murphy M. (2003). "Redoxregulation of cAMP-responsive element-binding protein and induction ofmanganous superoxide dismutase in nerve growth factor-dependent cell sur-vival." *J Biol Chem* 278: 16510–16519.
4. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ. (2010). "Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology." *Epilepsia* 51(4): 676-85.
5. Bellet, M. M., y P. Sassone-Corsi. (2010). "Mammalian circadian clock and metabolism -the epigenetic link." *Journal of Cell Science* 123 (22): 3837-3848
6. Blume WT. (2003). "Diagnosis and management of epilepsy." *CMAJ*. 168: 441–448.
7. Brito Sampaio L.P. (2014). Cap18: "Dietas cetogénicas y otras alternativas terapéuticas. En "Tratamiento Farmacológico de las Epilepsias." Ed Leitura Médica Ltda pag 208.
8. Cabo de la vega C, Villanueva-Hernández P, Prieto-Marín A. (2006). "Neuroquímica de la epilepsia, neurotransmisión inhibitoria y modelos experimentales, nuevas perspectivas." *Rev Neurol* 42: 159–168.
9. Cahill FG Jr. (2006) "Fuel metabolism in starvation." *Annu Rev Nutr* 26: 1–22.

10. Calabrese EJ, Baldwin LA. (2002). "Defining hormesis." *Hum Exp Toxicol* 21: 91–97.
11. Cavalheiro EA. (1995). "The pilocarpine model of epilepsy." *Ital J Neurol Sci* 16: 33–37.
12. Chung KW, Kim DH, Park MH, Choi YJ, Kim ND, Lee J, Yu BP, Chung HY. (2013). "Recent advances in calorie restriction research on aging." *Exp Gerontol* 48: 1049–1053.
13. Cole AJ, Koh S, Zheng Y. (2002). "Are seizures harmful: What we can learn from animal models?." *Prog Brain Res* 135: 13–23.
14. Curia G, Longo D., Biagini G, Jones RS, Avoli M. (2008). "The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy." *J Neurosci Methods*. 172: 143–157.
15. Dal-Pizzol F, Klamt F, Vianna MM, Schroder N, Quevedo J, Benfato MS, Moreira JC, Walz R. (2000). "Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats." *Neurosci Lett*. 291: 179–182.
16. Dallman, M.F., Akana, S.F., Bhatnagar, S., Bell, M.E., Choi, S., Chu, A., Horsley, C., Levin, N., Meijer, O., Soriano, L.R. (1999). "Starvation: early signals, sensors, and sequelae." *Endocrinology* 140: 4015–4023.
17. De Keizer PL, Burgering BM, Dansen TB. (2011). "Forkhead box o as a sensor, mediator, and regulator of redox signaling." *Antioxid Redox Signal*. 14: 1093–1106.
18. Dulac O y Takahashi T, (2013). "Status epilepticus". *Handbook of Clinical Neurology.* Vol 111 (3rd series). Pediatric Neurology Part I.

19. Feria-Romero I, Alonso Vanegas M, Escalante Santiago D, Villeda Hernandez J, Orozco Suarez S, (2013). "Mechanisms of neurodegeneration in temporal lobe epilepsy." *Rev Chil Neuro-Psiquiat* 51: 137–148.
20. Ferrerira Caboclo L. (2014). Cap23: "Epilepsias refractarias." En "Tratamiento Farmacológico de las Epilepsias." Ed Leitura Médica Ltda pag 276.
21. Ferreira B, Valle A, Cavalheiro E, Timo Iaria C, (1999). "Prevalence of epileptic seizures along the wakefulness sleep cycle rats submitted to status epilepticus in early life." *Dev Neurosci* 21: 339–344.
22. Finkel T, Holbrook NJ (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." *Nature*. 408: 239–247.
23. Fisher RS. (2014) "A practical clinical definition of epilepsy." *Epilepsia*. 55: 475–482.
24. Fontana L, Partridge L, Longo VD. (2010). "Extending healthy life span— from yeast to humans." *Science*. 328: 321–326.
25. Frantseva MV, Velazquez JL. Perez, Tsoraklidis G, Mendonca AJ, Adamchik Y, Mills LR, Carlen PL, Burnham MW. (2000). "Oxidative stress is involved in seizure-induced neurodegeneration in the kindling model of epilepsy." *Neuroscience*. 97: 431–435.
26. Freeman J, Veggiotti P, Lanzi G, Tagliabue A, Perucca E (2006). "The ketogenic diet: From molecular mechanisms to clinical effects." *Epilepsy Res* 68: 145–180.
27. Frischy J, Kiener T, Bouillere T, Loup T, (1999) "GABAergic neurons and GABAA receptor in temporal lobe epilepsy." *Neurochemistry international*. v. 34: 435-445.
28. Gano LB. Patel M Rho MJ. (2014). "Ketogenic diets, mitochondria, and neurological diseases." *J Lipid Res* 55: 2211–2228.

29. García-Arellano H, Vazquez Duhalt R. (1998). "Cuantificación de proteínas: Una revisión." *Bio Tecnología* vol 3.
30. García-García ME, García-Morales I, Matías GJ. (2009). "Modelos experimentales en epilepsia." *Neurología*, 181-188.
31. Gérard-Monnier D, Erdelmeler I, Régnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudière J, (1998). "Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4 hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation." *Chem Res Toxicol* 11: 1176–1183.
32. Gluck MR, Jayatilleke E, Shaw S, Rowan AJ, Haroutunian V. *CNS* (2000). "Oxidative stress associated with the kainic acid rodent model of experimental epilepsy." *Epilepsy Res* 39: 63–71.
33. Grone, B. P., y S. C. Baraban. (2015). "Animal models in epilepsy research: legacies and new directions." *Nat Neurosci* 18 (3): 339-343.
34. Hamilton SE, Loose MD, QiM, Levey AI, Hille B, McKnight GS. (1997). "Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice." *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13311–13316.
35. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K. (2009). "Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice." *Nature*. 460: 392–395.
36. Kashiwaya Y, Takeshima T, Mori N, Nakashima K, Clarke K, Veech RL. (2000). "D-beta-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 5440–4544.
37. Koh S, Storey T, Santos B, Yian A, Cole A. (2001). "Early life seizures in rats increase susceptibility to seizure induced brain injury in adulthood." *Neurology* 57: Supp4: S22-28.
38. Kong Q y Ling C L. (2010). "Oxidative damage to RNA: mechanisms consequences, and diseases." *Cellular and Molecular Life Sci*. 67: 1817–1829.

39. Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, Huang TT, Bos JL, Medema RH, Burgering BM. (2002). "Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress." *Nature* 419: 316–321.
40. Laffel L. (1999) "Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes." *Diabetes Metab Res Rev* 15: 412–426.
41. Landgrave-Gómez J, Mercado-Gómez O, Guevara-Guzman R. (2015). "Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases." *Front Cell Neurosci* 9: 58.
42. Landgrave-Gómez J, Mercado-Gómez O.F, Vázquez-García M, Rodríguez-Molina V, Córdova-Dávalos L, Arriaga-Ávila V, Miranda-Martínez A y Guevara-Guzmán R. (2016). "Anticonvulsant effect of time-restricted feeding in a pilocarpine-induced seizure model: Metabolic and epigenetic implications." *Front Cell Neurosci*. 10: 7.
43. Laurindo F, Fernandes D, Santos C. (2008). "Assessment of Superoxide production and NADPH oxidase activity by HPLC analysis of dihydroethidium oxidation products." *Methods Enzymol*. 441: 237–260.
44. Lasarge CL, Danzer SC. (2014). "Mechanisms regulating neuronal excitability and seizure development following mTOR pathway hyperactivation." *Front Mol Neurosci*. 7: 18.
45. Lemos T, Cavlheiro EA. (1995). "Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats." *Exp Brain Res* 102: 423–428.

46. Liu L, Peritore C, Ginsberg J, Kayhan M, Donmez G. (2015). "SIRT3 attenuates MPTP-induced nigrostriatal degeneration via enhancing mitochondrial antioxidant capacity." *Neurochem Res* 40: 600–608.
47. Long J, Wang X, Gao H, Liu Z, Liu C, Miao M, Liu J. (2006). "Malonaldehyde acts as a mitochondrial toxin: Inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in isolated rat liver mitochondria." *Life Sci* 79: 1466–1472.
48. Longo VD, Mattson MP. (2014). "Fasting: molecular mechanisms and clinical applications." *Cell Metab* 19: 181–192.
49. Lüttjohann, A, Fabene, PF, van Luijtelaaar G. (2009). "A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats." *Physiol Behav* 98: 579–586.
50. Lv R, Mao N, Wu J, Lu C, Ding M, Wu Y, Shi Z. (2015). "Neuroprotective effect of allicin in a rat model of acute spinal cord injury." *Life Sci* 143: 114–123.
51. Maalouf M, Rho JM, Mattson MP. (2009). "The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies." *Brain Res Rev* 59: 293–315.
52. Malinska D, Kulawiak B, Kudin AP, Kovacs R, Huchzermeyer C, Kann O, Szewczk A y Kunz W. (2010). "Complex III-dependent superoxide production of brain mitochondria contributes to seizure-related ROS formation." *Biochim Biophys Acta* 1797: 1163–1170.
53. Marchi N, Fan Q, Ghosh C, Fazio V, Bertolini F, Betto G, Batra A, Carlton E, Najm I, Granata T, Janigro D. (2009). "Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus" *Neurobiol Dis* 33: 171–181.

54. Mattson MP. (2012). "Energy intake and exercise as determinants of brain health and vulnerability to injury and disease." *Cell Metab* 16: 706–722.
55. Mattson, M.P. y Cheng, A., (2006). "Neurohormetic phytochemicals: low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses." *Trends Neurosci* 29: 632–639.
56. Mattison J, Roth G, Beasley TM, Tilmont E, Handy AM, Herbert RL, Longo DL, Allison DB, Young JE, Bryant M, Barnard D, Ward WF, Qi W, Ingram DK, de Cabo R. (2012) "Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study." *Nature* 489: 318–321.
57. Masuda, R., Monahan, J.W., Kashiwaya, Y., (2005). "D-betahydroxybutyrate is neuroprotective against hypoxia in serum-free hippocampal primary cultures." *J Neurosci Res* 80: 501–509.
58. McCord JM. (2000). "The evolution of free radicals and oxidative stress." *Am J Med* 108: 652-659.
59. McNally MA y Hartman AL. (2012). "Ketone bodies in epilepsy." *J Neurochem* 121: 28–35.
60. Méndez-Armenta M, Nava-Ruíz C, Juárez-Rebollar D, (2014). "Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy." *Oxid Med Cell Longev* 2014: 293689.
61. Milder JB, Liang LO, Patel M. (2010). "Acute oxidative stress and systematic Nrf2 activation by the ketogenic diet." *Neurobiol Dis* 40: 238–244.
62. Miranda HH, y Godoy J, (2006). Tomado de <http://escuela.med.puc.cl/publ/cuadernos/2006/epileptogenesis.pdf>  
Consultado en 2016.

63. Morimoto K, Fahnstock M, Racine RJ. (2004). "Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain." *Prog Neurobiol* 73: 1–60.
64. Newman, J. C., y E. Verdin. (2014). "Ketone bodies as signaling metabolites." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 25 (1): 42-52
65. Noh HS, Cho GJ, Nilufar R, Hah YS, Bong JH, Kang SS, Choi WS. (2006). "Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity." *J Neurosci Res* 83: 702–709.
66. Noh HS, Kim YS, Lee HP, Chung KM, Kim DW, Kang SS, Choi WS. (2003). "The protective effect of a ketogenic diet on kainic acid-induced hippocampal cell death in the male ICR mice." *Epilepsy Res* 53: 119–128.
67. Oroquieta J, Arellano J, Alonso L, Muñoz A (2002). "Neuropatología de la epilepsia del lóbulo temporal. Alteraciones primarias y secundarias de los circuitos corticales y epileptogenicidad." *Rev Neurol* 34: 401–408.
68. Organización Mundial de la Salud (OMS 2016). Disponible en <http://www.who.int/topics/epilepsy/es/>
69. Pani G. (2015). "Neuroprotective effects of dietary restriction: Evidence and mechanisms." *Semi Cell Dev Biol* 40: 106–114.
70. Pastor J, Uzcátegui Y, Gal B, Ortega C, Sola R, Menéndez L (2006). "Bases fisiopatológicas de la epilepsia del lóbulo temporal: estudios en humanos y animales." *Rev Neurol*. 46: 663–673.
71. Pestana RR, Kinjo ER, Hernandez MS, Britto, LR. (2010) "Reactive oxygen species generated by NADPH oxidase are involved in neurodegeneration in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy." *Neurosci Lett*. 484: 187–191.
72. Patel M, Brian JD. (1996). "Requirement for superoxide in excitotoxic cell death." *Neuron* 16: 345–355.

73. Patel M, Waldbaum S. (2010). "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: a contributing link to acquired epilepsy?" *J Bioenerg Biomembr* 42: 449–455.
74. Poulet R, Gentile MT, Vecchione C, Distaso M, Aretini A, Fratta L, Russo G, Echart C, Maffei A, De Simoni MG, Lembo G. (2006). "Acute hypertension induces oxidative stress in brain tissues." *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 253–262.
75. Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E, Chen D. (2010). "Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation." *Cell Metab* 12: 662–667.
76. Racine, RJ. (1972). "Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32: 281–294.
77. Rang y Dale (2012). "Farmacología" 7° Ed. Elsevier Pag.157–158.
78. Rattan SI. (2004). "Aging, anti-aging, and hormesis." *Mech Ageing Dev* 125: 285–289.
79. Reddy SD, y Kuruba R. (2013). "Experimental models of status epilepticus and neuronal Injury for evaluation of therapeutic interventions." *Int J Mol Sci* 14: 18284–18318.
80. Rho MJ. (2015). "How does the ketogenic diet induce anti-seizure effects?" *Neurosci Lett* S0304-3940: 300054-300059.
81. Robert L, Robert J, (2015). "Stress in biology and medicine, role in aging." *Pathologie Biologie* 63: 230–423

82. Rocha L. (2005). "Epilepsia. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias." vol. 56 núm. 3.
83. Selman C, Tullet JM, Wieser D, Irvine E, Lingard SJ, Choudhury AI. (2009). "Ribo-somal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span." *Science*. 326: 140–144.
84. Shimazu, T., Hirschey M. D., Newman J., He W., Shirakawa K., Le Moan N., Grueter, Lim H., Saunders, Stevens R. D., Newgard C. B., Farese R. V., de Cabo R., Ulrich S., Akassoglou K., y Verdin E. (2013). "Suppression of Oxidative Stress by  $\beta$ -Hydroxybutyrate, an Endogenous Histone Deacetylase Inhibitor." *Science* 339 (6116): 211-214.
85. Singh Z, Kaur R, (2014). "Use of malondialdehyde as a biomarker for assessing oxidative stress in different disease pathologies: a review." *Iranian J Publ Health* 43: 7–16.
86. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM. (2006). "Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators." *Cell* 127: 397–408.
87. Sokoloff L. (1973). "Metabolism of ketone bodies by the brain." *Annu Rev Med* 24: 271–280.
88. Tejada S, Sureda A, Roca C, Gamundi A, Esteban S. (2007). "Antioxidant response and oxidative damage in brain cortex after high dose of pilocarpine." *Brain Res Bull* 71: 372–5.
89. Terra VC y Sakamoto AC. 2014. Cap:1 Clasificación de las crisis epilépticas para la programación terapéutica. En "Tratamiento Farmacológico de las Epilepsias." Ed. Leitura Médica Ltda. pag. 30.

90. Thaler S, Choragiewicz TJ, Rejdak R, Fiedorowicz M, Turski WA, Tulidowicz-Bielak M, Zrenner E, Schuettauf F, Zamowski T. (2010). "Neuroprotection by acetoacetate and  $\beta$ -hydroxybutyrate against NMDA-induced RGC damage in rat-possible involvement of kynurenic acid." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 248: 1729–35.
91. Torres Aguilar C, Barbosa Almeida A, Pontes Araújo V. (2012) "Oxidative stress and epilepsy: Literature review." Hindawi Publishing Corporation *Oxid Med Cell Longev* 2012: 795259.
92. Tschopp J. (2011). "Mitochondria: sovereign of inflammation?" *Eur J Immunol* 41: 1196–1202.
93. Turski W, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar S, Kleinrok Z, Turski L. (1983). "Limbic seizures produced by pilocarpine I rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological study." *Behav Brain Res* 3: 315–335.
94. Uttara B, Singh V, Zamboni P y Mahajan R. (2009). "Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options." *Curr Neuropharmacol* 7: 65–74.
95. Vaccarezza MM, Silva WH. (2015). "Dietary therapy is not the best option for refractory nonsurgical epilepsy." *Epilepsia* 56: 1330–1334.
96. Valko D, Leibfritz J, Moncol M, Cronin M y Telser (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44–84.
97. Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, Kovacs AL, Orosz L, Muller F. (2003). "Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*." *Nature*. 426: 620.
98. Waldbaum S, Patel M. (2009) "Mitochondrial, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy." *Epilepsy Res.* 88: 23–45.

99. Wheless JW. (2008). "History of the ketogenic diet." *Epilepsia* 49 Suppl 8: 3–5.
100. Xie G, Tian W, Wei Y, Liu F. (2015). "The neuroprotective effects of  $\beta$  hydroxybutyrate on A $\beta$ -injected rat hippocampus *in vivo* and in A $\beta$ -treated PC-12 cells *in vitro*." *Free Radic Res.* 49: 139–150.
101. Yum MS, Ko TS, Kim DW. (2012). " $\beta$ -Hydroxybutyrate increases the pilocarpine induced seizure threshold in young mice." *Brain Dev.* 34: 181–184.
102. Zavala TC, y López ML. (2011). "Modelos experimentales de epilepsia en ratas en desarrollo." *Neurobiología. Revista Electrónica*, 16. (<http://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2011/4/Zavala-et al/HTML.html>).
103. Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B. (2003). "Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: Potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide." *Free Radic Biol Med* 34: 1359–1368.
104. Zielonka J, Kalyanaraman B. (2010). "Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: Another inconvenient truth." *Free Radic Biol Med* 48: 983–1001.
105. Zielonka J, Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B. (2008). "Detection of 2 hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine." *Nature Protoc.* 3: 8–21.