



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGIA**

**MANUEL VELASCO SUAREZ**

Efecto anticonvulsivo y neuroprotector de la dapsona evaluado in vivo por tomografía de emisión de positrones en un modelo de epilepsia inducido por ácido kaínico en ratas.

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA**

**EN NEUROLOGÍA**

**PRESENTA**

Iñigo Alonso Aguirre Aranda

**TUTOR DE TESIS**

María de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz



Ciudad de México, julio 2019



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.



---

**DR. PABLO LEON ORTIZ**  
**DIRECTOR DE ENSEÑANZA**

---

**DR. JOSÉ FERNANDO ZERMEÑO POHLS**  
**PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE NEUROLOGÍA**

---

**DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES ARACELI DÍAZ RUIZ**  
**TUTOR DE TESIS**

---

*ÍNDICE*

*Resumen (339)*

*Antecedentes (2859)*

*Hipótesis y objetivos específicos (253)*

*Materiales y métodos (1577)*

*Resultados (346)*

*Discusión/ conclusiones (987)*

*Figuras (7)*

*Referencias (35)*

---

## RESUMEN

**Introducción:** La epilepsia refractaria a medicamentos en esclerosis mesial temporal está caracterizada por la falta de respuesta al tratamiento con 2 fármacos antiepilépticos (FAE's) en dosis máxima dirigidos a un tipo específica de epilepsia; se ha convertido en un gran reto de salud pública debido a que afecta a personas de todas las edades.

**Materiales y métodos:** Se realizó un estudio experimental de esclerosis mesial temporal inducida por ácido kaínico en ratas albinas Wistar medida indirectamente por tomografía de emisión de positrones (PET) en un periodo máximo de 24 horas en dos fases. La primera fase se indujo el modelo con ácido kaínico y se midió por PET el metabolismo en un periodo de 24 horas. Así mismo se realizó vídeoencefalograma (vEEG) de 24 horas para determinar la actividad de epiléptica y su correlación con PET. En la segunda fase se repitió el modelo de ácido kaínico evaluándose el efecto de la dapsona en dosis de 12,5 y 25mg, valorándose su efecto anticonvulsivo y neuroprotector. Para comprobarlo se midieron niveles de caspasas (3 y 8) 72 horas posteriores, para medir la apoptosis hipocampal.

**Resultados:** El estudio de PET en el modelo de ácido kaínico mostró un pico de hipermetabolismo en la región hipocampal bilateral en las primeras 2 horas de haber inducido el modelo, con un hipometabolismo significativo 24 horas después ( $p=0.0001$ ). El estudio de PET de ácido kaínico y dapsona mostró mismo pico de hipermetabolismo, sin embargo presenta una tendencia a mantener metabolismo basal previo. En el vEEG se corroboró actividad epiléptica con pico máximo en primeras 2 horas, disminuyendo lentamente hasta recuperar estado basal a las 24 horas. Los niveles de caspasa 3 y 8 se redujeron de forma significativa en las ratas tratadas con dapsona ( $p=0,02$ ), pero no mostraron diferencia en dosis administrada.

**Conclusiones:** Este estudio demostró de forma contundente el efecto neuroprotector de la dapsona demostrado por PET restaurando el metabolismo cerebral, y por medición de caspasas disminuyendo la apoptosis neuronal de forma significativa. Esto sugiere efecto protector y anticonvulsivo de la dapsona.

## 1. ANTECEDENTES

La epilepsia como entidad nosológica afecta alrededor de 3 millones de personas en los Estados Unidos y aproximadamente a 65 millones de personas en todo el mundo, se observa en personas de todas las edades y de ambos sexos y cada año, cerca de 150,000 nuevos casos son diagnosticados en los Estados Unidos y es el cuarto trastorno neurológico más común en ese país después de la migraña, la enfermedad vascular cerebral y la demencia por Alzheimer (Devinsky et al., 2018), es un padecimiento crónico neurológico caracterizado por una predisposición a generar ataques epilépticos recurrentes no provocados. Un ataque epiléptico es un cambio conductual transitorio que puede tener signos objetivos o síntomas subjetivos (como pérdida de conciencia, rigidez, sacudidas, una sensación quemante gástrica ascendente, olor a caucho quemado o déjà vu), es causada por la actividad neuronal anormal excesiva y sincrónica en el cerebro (Reddy & Kuruba, 2013; Devinsky et al., 2018). El ataque epiléptico puede ser focal (60% de los casos, cuando la actividad neuronal anormal surge en un hemisferio), generalizado (40% de los casos, cuando la actividad neuronal anormal surge en ambos hemisferios) o de inicio desconocido (cuando el inicio de la crisis no se puede determinar). El inicio se puede determinar de forma confiable en > 80% de los pacientes en función de las características clínicas, la electroencefalografía (EEG) y en los hallazgos radiológicos. Aunque la causa de la epilepsia es desconocida en muchos pacientes, las crisis convulsivas pueden ser el resultado de casi cualquier alteración que perturbe la función cerebral y puede ser causada por una anomalía en la migración axonal cerebral, un desequilibrio en la modulación de los neurotransmisores inhibidores y excitadores, o alguna combinación de estos factores. Se ha descrito, que la epilepsia primaria es idiopática ("causa desconocida") y la epilepsia secundaria es referida como epilepsia adquirida, la cual puede tener su origen por una variedad de factores dentro de los que se incluyen: trauma, anoxia, desequilibrios metabólicos, tumores, encefalitis, abstinencia de drogas o neurotoxicidad. Por otra parte, los factores de riesgo más comunes para la epilepsia son las siguientes: macro y micro displasias cortico-subcorticales, factores genéticos e infecciones del sistema nervioso central. Es importante destacar que a la fecha se han identificado más de 500 genes asociados con la epilepsia (Reddy & Kuruba, 2013; Kandratavicius et al., 2014; Devinsky et al., 2018).

De acuerdo con reportes de la literatura, se sabe; que la epilepsia del lóbulo temporal (TLE) es la forma más común de epilepsia focal que afecta aproximadamente al 20% de todos los

pacientes en la cual se presentan la mayor incidencia de falta de respuesta a los tratamientos (epilepsia refractaria). Está bien caracterizado que la atrofia de las estructuras temporales mesiales está asociada con TLE y la esclerosis hipocampal es la anomalía histológica más frecuente en esta forma de epilepsia. Varios fármacos antiepilépticos (FAE's) están disponibles para el tratamiento de la epilepsia. Los FAE's actúan sobre diversos receptores para modificar de forma selectiva la excitabilidad de las neuronas al reducir las descargas focales y/o prevenir la propagación de la excitación. No obstante y a pesar de los avances en los estudios preclínicos y paraclínicos en epilepsia, casi el 30% de los pacientes con epilepsia tienen "epilepsia refractaria", definido como la falta de respuesta terapéutica al uso de 2 FAE's de forma correcta en dosis terapéuticas máximas (Depaulis & Hamelin, 2015; Devinsky *et al.*, 2018). Esta falta de eficacia terapéutica se debe en parte a la incompleta comprensión de los principales mecanismos fisiopatológicos, por lo que ha sido necesario recurrir al uso de modelos animales que reproduzcan las características de la enfermedad (Reddy & Kuruba, 2013) y evaluar nuevos fármacos antiepilépticos con mayor eficacia terapéutica. El ácido kaínico, (AK) un análogo del ácido glutámico, es un modelo de epilepsia del lóbulo temporal cuyo mecanismo de acción se caracteriza por activar los receptores del tipo no-NMDA para glutamato, lo que llevan a la entrada masiva de sodio en la célula activando diversos mecanismos de muerte celular, por necrosis y apoptosis (Fujikawa y cols., 2000). El AK es un análogo cíclico de L-glutamato un agonista para el ácido  $\alpha$ -amino 3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) y los receptores de kainato. Fue aislado y extraído a principios de la década de 1950, del alga roja (*Digenea simplex*) encontrada en aguas tropicales y subtropicales. Se llamó ácido digénico, sin embargo, posteriormente este término se modificó a AK para evitar la confusión con otros derivados de *Digenea*. El AK primeramente fue utilizado para erradicar la ascariasis, una enfermedad causada por el gusano parásito *Ascaris lumbricoides*. Sin embargo, posteriormente se descubrió que después de la aplicación intracerebral en ratas producía respuestas excitadoras prolongadas en neuronas corticales, causando crisis convulsivas. Debido a este acontecimiento se determinó que podría utilizarse como un potente análogo del glutamato, y como inductor de despolarización cortical sostenida, así como eventualmente producir muerte celular, un fenómeno primordial para el TLE (Löscher, 2011, 2011; Lévesque & Avoli, 2013; Reddy & Kuruba, 2013; Jefferys *et al.*, 2016; Lévesque *et al.*, 2016). Lo mencionado previamente montó las bases para identificación de nuevos subtipos de receptores de glutamato, una mejor caracterización de estructuras y vías glutamatérgicas y finalmente, el desarrollo de un nuevo modelo animal de epilepsia del

lóbulo temporal, caracterizado por un período latente, seguido de crisis convulsivas espontáneas refractarias, similar a la TLE. El uso de AK también condujo a una mejor comprensión de diversos trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica y la esclerosis múltiple (Lévesque & Avoli, 2013). Durante los últimos treinta años, muchos estudios han identificado con éxito la localización de los receptores de AK (RAK). Fisiológicamente los RAK se pueden encontrar en diferentes niveles elevados de expresión en la amígdala, la corteza entorrinal, los núcleos de la base y el cerebelo. También se han encontrado títulos elevados en el hipocampo en la hendidura pre y postsináptica. Las subunidades KA1 (GluK4) se presentan en título elevados en las células piramidales CA3, pero solo se expresan débilmente en células piramidales CA1. Las subunidades KA2 (GluK5) han sido encontradas en títulos elevados en las células piramidales CA1 y CA3. Por lo tanto, la alta afinidad de los receptores KA1 y KA2 por el glutamato y sus altas tasas de expresión en la región CA3 del hipocampo hacen que esta región sea muy susceptible al daño excitotóxico inducido por AK, y frecuentemente hace que el hipocampo sea la zona gatillo de crisis convulsivas en este modelo. (Lévesque & Avoli, 2013; Lévesque et al., 2016; Falcón-Moya et al., 2018). El AK se puede administrar sistémicamente o directamente en una región específica del cerebro para producir estado epiléptico. Se administra una dosis (10-18 mg / kg) de AK que produce crisis convulsivas conductuales típicas que comienzan con arresto de la mirada, seguidos por movimientos de la cabeza y sacudidas de perro mojado. Aproximadamente 1 hora después de la inyección de AK, las ratas presentan convulsiones motoras límbicas recurrentes tales como masticación, clonus facial, temblor de extremidades antes de desarrollar estado epiléptico que puede persistir durante horas. También el modelo se puede reproducir en dosis más pequeñas de AK (5 mg / kg) hasta que el animal presente estado epiléptico. Este enfoque reduce significativamente la mortalidad de los animales en este modelo de roedor (Raol & Brooks-Kayal, 2012; Lévesque & Avoli, 2013; Lévesque et al., 2016).

En 1978 fue realizado uno de los primeros estudios que muestran un efecto de AK sobre las neuronas hipocampales. Estos experimentos demostraron que inyecciones intraventriculares de AK (0,5 nmol) en ratas Sprague-Dawley en un periodo de 1-3 días causaron degeneración de células piramidales en CA3 en el polo rostral del hipocampo, mientras que en dosis más altas (0,8 µg) causa pérdida neuronal en regiones más caudales del hipocampo. Las dosis superiores a 0,8 µg produjeron neurodegeneración en CA1 y CA2. Estudios posteriores mostraron patrones similares de neurodegeneración del hipocampo,



posteriores a la administración intraamigdaloides de AK. Estos hallazgos sugieren que la administración intracerebral de AK en el hipocampo o la amígdala representan un modelo viable de epilepsia del lóbulo temporal, ya que reproducen los cambios histopatológicos típicos observados en pacientes epilépticos (Raol & Brooks-Kayal, 2012; Lévesque & Avoli, 2013; Kandravicius et al., 2014; Jefferys et al., 2016; Lévesque et al., 2016; Nirwan et al., 2018).

### **1.1. Dapsona como anticonvulsivo**

La dapsona o 4, 4-diaminodifenilsulfona (DDS), por otra parte, es un fármaco de la familia de las sulfonas, que desde la década de los 40s demostró ser eficaz para suprimir infecciones experimentales por bacilos de tuberculosis y la lepra en la rata; después de esto se obtuvieron buenos resultados en estudios de tratamiento de lepra en humanos. Diversos estudios señalan que el tratamiento con DDS no incrementa el riesgo de producir anomalías en el feto si se administra durante cualquier trimestre del embarazo (Kahn, 1985). Aunque no se conocen los mecanismos por los cuales la DDS ejerce un efecto anti-epiléptico, desde 1991 se han realizado estudios en modelos animales de epilepsia de lóbulo temporal del tipo kindling que han demostrado que la DDS tiene una actividad anticonvulsivante en este modelo. De igual forma nuestro grupo ha caracterizado la eficacia de la DDS como anticonvulsivo en el modelo experimental de epilepsia inducida por AK (Rios y cols., 1993; Atagracia y cols., 1994). En estos estudios se demostró electroencefalográficamente una disminución de la actividad epiléptica en ratas sometidas a este modelo. Igualmente se demostró la capacidad de la DDS para atenuar las crisis límbicas conductuales inducidas por AK. Se observó que dosis de 9.375-12.5 mg/kg de DDS administrada 30 minutos antes de una inyección única de AK (10 mg/kg), son capaces de disminuir el tiempo de crisis electroencefalográfica en 52% y 82% para cada dosis, respectivamente, comparándolas con ratas a las que solo se administró AK. Las ratas tratadas con la dosis de 12.5 mg/kg de DDS tuvieron una disminución tanto de las sacudidas corporales y cefálicas (crisis límbicas) (58%) como de la mortalidad inducida por AK (75%) de forma estadísticamente significativa (Atagracia y cols., 1994). Las pruebas farmacológicas que demuestran la eficacia y seguridad de la DDS para su uso en pacientes con epilepsia refractaria a fármacos se obtuvieron en un estudio clínico abierto realizado en un grupo de 22 pacientes con diagnóstico de epilepsia refractaria que acudieron al servicio de consulta externa y al servicio de Neurología del Instituto de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez, de la ciudad de México. Los resultados de eficacia demostraron

que la DDS a una dosis entre 50 y 100 mg por día, fue capaz de reducir en 66% en promedio el número total de crisis epilépticas. El porcentaje de pacientes que redujeron la frecuencia de sus crisis en 50 % o más fue de 73 % (16 pacientes de 22). El efecto anti-convulsivo de la DDS fue mayor al reducir las crisis generalizadas (82 %, 18 pacientes de 22), que para reducir las crisis parciales complejas (50 %, 11 pacientes de 22), así mismo, se observó que en los pacientes tratados con DDS y primidona la reducción de las crisis totales fue mayor que con otras combinaciones de fármacos más DDS. El tratamiento se empleó de manera segura en estos pacientes, ya que no se presentaron efectos adversos graves. Los efectos adversos leves fueron: palidez (27 %, 6 pacientes de 22), somnolencia (4.5 %, 1 paciente de 22) cefalea (32%, 7 pacientes de 22) y metahemoglobinemia subclínica, por análisis de laboratorio (50 %, 11 pacientes de 22) (Lopez-Gomes, et al 2011). Por otra parte, en 1997, Santamaría y colaboradores demostraron que la DDS tiene efecto neuroprotector en un modelo de daño inducido por ácido quinolínico un agonista endógeno de los receptores del tipo NMDA para glutamato y posteriormente se ha demostró que el tratamiento con DDS disminuye la peroxidación de lípidos y previene las alteraciones morfológicas en el cuerpo estriado de la rata en este mismo modelo (Rodríguez y cols., 1999). Así mismo, en el 2013 Diaz-Ruiz y colaboradores demostraron que la DDS tiene efecto antioxidante, anticonvulsivo y neuroprotector después de la administración de AK en ratas. Es importante destacar que la sobre excitación mediada por glutamato y sus agonistas como el AK producen excitotoxicidad, esto incrementa las concentraciones de calcio intracelular y como consecuencia de este evento, los transportadores de calcio mitocondrial lo ingresan, lo que altera el potencial de membrana dando como resultado una falla energética y posterior muerte celular (Siegel y cols., 2006), tomando en consideración lo anterior, recientemente nuestro grupo reporto que la DDS inhibe en un 40% las corrientes de calcio mediadas por la activación del receptor NMDA en un cultivos de neuronas disociadas, esto fue evaluado utilizando técnicas de patch clamp (Juárez-Nájera y cols, 2015), tomando en cuenta estos hallazgos, en este proyecto queremos evaluar si la regulación de la excitotoxicidad por efecto de la DDS reduce la falla energética lo que se traducirá en menores alteraciones metabólicas. Para demostrar esto, utilizaremos una técnica de imagen de tomografía de emisión de positrones y cuantificaremos la incorporación de glucosa marcada radioactivamente. Así mismos, evaluaremos por técnicas bioquímicas la actividad de las caspasas 9 y 3 como marcadores de apoptosis; pues se sabe que cuando se altera el potencial de la membrana interna mitocondrial por efecto del calcio, se abre el poro de transición con la subsecuente liberación del citocromo

C el cual recluta una serie de moléculas que activan la vía intrínseca con a treves de la activación de dichas caspasas (Siegel y cols., 2006). Es importante mencionar que, a pesar de que nuestro grupo ha reportado el beneficio terapéutico de la DDS en estudios conductuales y diversos marcadores bioquímicos, es necesario reunir la mayor cantidad de evidencia para caracterizar sus mecanismos de acción y seguridad terapéutica, lo cual dará certidumbre de su uso en pacientes con epilepsia resistente a fármacos. Otra de las aportaciones de este estudio será desarrollar y estandarizar un método cuantitativo no invasivo para evaluar la integridad celular lo que demostrará el efecto neuroprotector del tratamiento.

### **1.2. Tomografía de emisión de positrones.**

Se sabe que la mayoría de los pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (TLE) refractaria a FAE's muestran un hipometabolismo mesial prominente en el lóbulo temporal epileptogénico de acuerdo con resultados obtenidos con estudios de PET utilizando 18 fluorodesoxiglucosa [18F] (FDG-PET). Así mismo, es notable destacar que la FDG-PET puede lateralizar de manera confiable el hipocampo afectado en pacientes que carecen de los cambios típicos de la esclerosis temporal mesial por resonancia magnética. Sin embargo, la fisiopatología subyacente acerca del hipometabolismo hipocampal y su relación con la epileptogénesis y la gravedad de TLE son desconocidas. En estudios de pacientes con TLE establecida como refractaria a FAE's, se ha encontrado poca relación entre la reducción del hipometabolismo observado en el FDG-PET y otros cambios fisiopatológicos asociados con el TLE. Los estudios de flujo sanguíneo cerebral y esclerosis hipocampal han demostrado una correlación limitada y el grado de hipometabolismo detectado por FDG-PET, mientras que se ha demostrado cierta correlación entre el grado de hipometabolismo y la duración de la epilepsia, así como el número de crisis convulsivas presentadas. Con base en esto, es incierto si el hipometabolismo es un marcador del proceso epileptogénico primario o, alternativamente, una consecuencia secundaria de la epilepsia crónica (Jupp *et al.*, 2012). El enfoque de varios estudios de imágenes subsecuentes en modelos de epilepsia han tenido como objetivo caracterizar alteraciones en el metabolismo de la glucosa cerebral con FDG-PET, un análogo de glucosa marcado con el emisor de positrones 18F, con vida media aproximada de 60 a 110 minutos, los resultados han mostrado un aumento importante en el metabolismo de la glucosa en el cerebro después de las convulsiones agudas provocadas por excitotoxinas como el AK y la pilocarpina en ratas y ratones. (Bertoglio *et al.*, 2017). Por otra parte, el modelo Kindling

permite evaluar la generación y propagación de actividad eléctrica cerebral durante el proceso de epileptogénesis. Estudios autorradiográficos han mostrado que una gran cantidad de regiones corticales están involucradas en las primeras etapas de activación. Recientemente se demostró que el FDG-PET puede emplearse para diferenciar entre los animales resistentes y no resistentes al pentilentetrazol (PTZ) y con el modelo kindling (no resistentes) que se caracterizan por imagen con hipometabolismo cortical (Bertoglio *et al.*, 2017), en este estudio se demostró que en la fase de estado epiléptico el PET-FDG se observa hipermetabolismo, no así en la fase temprana (1-2 días) donde se presenta hipometabolismo, los hallazgos mostraron también que el hipometabolismo generalizado se normaliza para la mayoría de las regiones extra-temporales en la fase de epilepsia crónica, sin embargo pudiera persistir en estructuras límbicas como el hipocampo y el lóbulo temporal, además se encontró que el hipometabolismo temprano (día 2) en la corteza entorrinal se correlacionaba con el desarrollo posterior de crisis convulsivas recurrentes espontáneas, (SRS) siendo monitoreadas por registros continuos de EEG durante 6 semanas. (Bertoglio *et al.*, 2017). Específicamente, la captación temprana de FDG se correlacionó positivamente con la duración de la fase latente, así como con la frecuencia de SRS durante el período crónico. Por lo tanto, los datos derivados de otros modelos pueden ser complementarios y ayudar a aumentar nuestra comprensión de este padecimiento (Bertoglio *et al.*, 2017).

## **2. HIPÓTESIS**

Si la dapsona tiene efecto anticonvulsivo y neuroprotector después de la administración del ácido kaínico, entonces se observarán menores alteraciones metabólicas, reducción en la muerte celular por apoptosis y disminución de la actividad eléctrica convulsiva en el cerebro de los animales tratados al ser comparados con el grupo control.

### **3. OBJETIVOS Y METAS**

#### **3.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto anticonvulsivo y neuroprotector de la dapsona realizando estudios de tomografía de emisión de positrones, electroencefalografía y ensayos bioquímicos e histológicos de apoptosis en un modelo de epilepsia del lóbulo temporal inducido por la administración de ácido kaínico en la rata.

#### **3.2. Objetivos particulares**

1. Evaluar el efecto anti convulsivo y neuroprotector de la dapsona realizando estudios de tomografía de emisión de positrones para cuantificar la captación de fluorodesoxiglucosa como marcador de la integridad metabólica a 1, 2, 3, 4, 21, 22, 23 y 24 h post inyección de ácido kaínico y compararla con la del grupo control no tratado.

2. Evaluar el efecto neuroprotector de la dapsona con base en la actividad de las caspasas 3, 9 (vía intrínseca mediada por calcio) y 8 (vía extrínseca mediada por inflamación), ANEXINA-V y TUNEL como marcadores de apoptosis a 72 h después de la administración del ácido kaínico y compararla con el grupo control.

3. Evaluar el efecto anticonvulsivo de la dapsona a través de un ensayo de electroencefalografía a 1, 2, 3, 4, 21, 22, 23 y 24 h post inyección de ácido kaínico y compararla con la del grupo control no tratado.

### **4. METODOLOGÍA**

#### **4.1 Animales**

Todos los procedimientos para el manejo de animales serán realizados de acuerdo con las Guías regulatorias para el cuidado y uso de animales de laboratorio conforme la NOM-062-ZOO-1999 y serán revisados y observados por el Comité Institucional para el Cuidado de los Animales de Laboratorio del Instituto, (CICUAL- INNN). Se utilizarán ratas macho de

250 a 300 g de peso, de la cepa Wistar mantenidas bajo condiciones controladas de bioterio con ciclos de 12/12 h de luz/obscuridad con libre acceso al agua y al alimento.

#### **4.2 Diseño experimental**

Los animales recibirán por vía i.p. 10 mg/kg de AK para reproducir el modelo de epilepsia del lóbulo temporal de acuerdo con lo reportado por Ríos y cols., (1993). Se probarán dos dosis de DDS de acuerdo con lo reportado por (Rodríguez y cols., 1999), la dosis baja de 12.5 mg/kg de peso y una dosis alta de 25 mg/kg iniciando el tratamiento 30 minutos previos a la administración del AK en dosis única. Se formarán 3 grupos experimentales de manera aleatoria como sigue: Grupo 1: Control: AK más vehículo (solución salina) n = 10, grupo 2: AK y DDS a una dosis de 12.5 mg/kg; n = 10, Grupo 3: AK más DDS a una dosis 25 mg/kg; n = 10.

#### **4.3. Análisis mediante tomografía por emisión de positrones**

Se realizarán estudios usando tomografía por emisión de positrones con el microPET INVEON-SIMENS de la unidad Radiofarmacias-Ciclotrón de la Facultad de Medicina de la UNAM

Se utilizarán 10 ratas, evaluadas en tres estudios PET con 18 Fluorodeoxiglucosa (18FDG) cada uno, como se ilustra en la figura 1:

Los animales serán mantenidos con ayuno de 6 h, posteriormente se realizará la administración del radiofármaco y se esperaran 40 min para tener la biodistribución completa, se realizará un estudio curso temporal para establecer los picos máximos y mínimos de captación. Con la información del gasto metabólico a 1,2,3 y 4 horas después de la inyección intraperitoneal de ácido kaínico, así como a 21, 22, 23 y 24 h posteriores al mismo, las imágenes serán normalizadas anatómicamente a un atlas en PMOD 3.8 para hacer análisis semicuantitativo de la captación en distintas regiones del sistema nervioso central, normalizadas a la captación en el puente. Los animales tratados con DDS iniciarán el tratamiento 30 min antes de la administración del AK en dosis única.

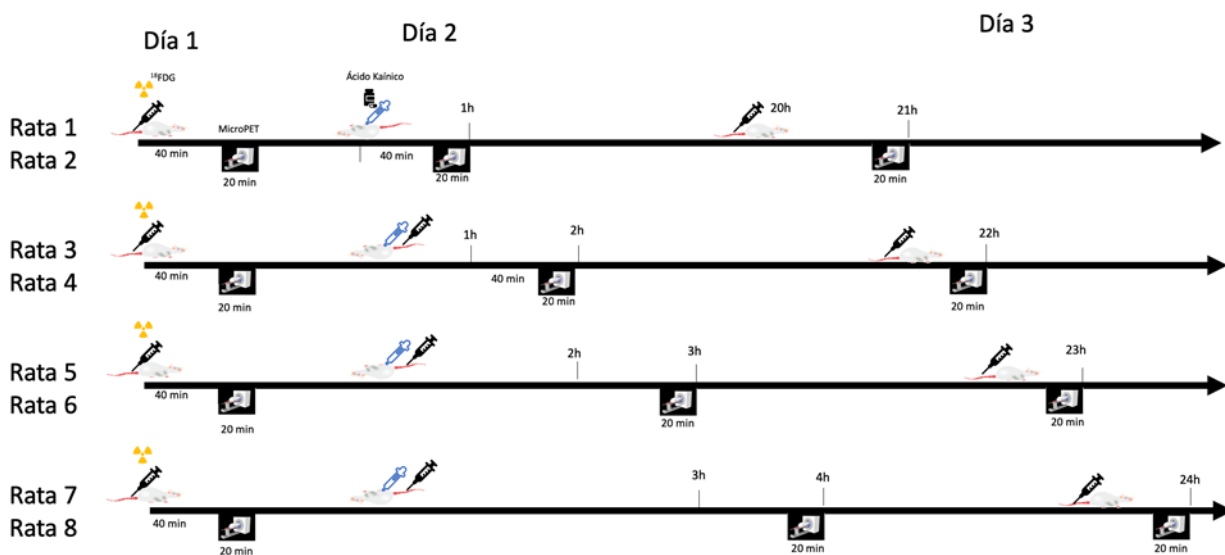


Figura1. Diseño experimental del estudio PET.

#### 4.4. Ensayo colorimétrico de actividad de caspasa 3, 8 y 9.

Para realizar el ensayo de actividad de las caspasas, se tomarán muestras de hipocampo izquierdo 72 h después de la administración de AK, tiempo en el cual se ha observado incremento en la muerte celular (Yang y cols., 2016), todas las muestras serán homogeneizadas en buffer de RIPA para obtener una concentración de 300  $\mu$ g de proteína por muestras; esta concentración se determinará mediante la cuantificación de proteínas por el método de Lowry, posteriormente se utilizarán kits de ensayo para evaluar las actividades de las caspasa 8, 9 y 3 a través de un método colorimétrico comercializados por Millipore, una vez que las muestras sean homogeneizadas con buffer RIPA se incubarán en hielo 10 minutos e inmediatamente después las muestras se centrifugarán a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4°C; Se tomarán del sobrenadante los microlitros necesarios para obtener una concentración necesaria de proteína y se colocarán en cada uno de los pozos de la placa de ELISA, posteriormente se les adicionará el volumen necesario de agua desionizada para obtener 70  $\mu$ l y finalmente, se agregarán 20  $\mu$ l de buffer de ensayo 5 X y 10  $\mu$ l de sustrato para caspasa; se incubarán a 37°C durante 1 hora. Se generará una curva estándar de p-nitroanilina (pNA) en un rango de concentración de 10  $\mu$ M a 1mM diluyendo la solución stock de pNA en buffer de ensayo 1X, se colocarán 100  $\mu$ l de cada dilución en la placa de ELISA y se leerán junto con las muestras en un lector de placas de ELISA a 405 nm.

#### **4.5. Ensayos de inmunohistoquímica**

Los hipocampos derechos serán fijados por inmersión durante 96 horas (Paraformaldehído al 4% en 0,1 M de PBS), criopreservados en sacarosa al 30% por 24 horas y cortados a 14µm de grosor en un criostato. Los cortes serán montados en láminas previamente tratadas con poly L-lisina para evitar su desprendimiento y almacenados a 4°C hasta su análisis.

#### **4.6. Ensayo de inmunofluorescencia para detección de Anexina V/ NeuN**

Los cortes histológicos serán hidratados por 5 minutos con PBS-Tritón 0,1M, bloqueados con suero normal de cabra por 30 minutos e incubados con el anticuerpo primario NeuN mouse/ Anexina V rabbit (Millipore y Santa cruz biotechnology respectivamente) por 24 horas en condiciones húmedas y refrigeración, posteriormente se realizarán 2 lavados con PBS y se incubarán con el anticuerpo secundario Alexa 546 Anti-rabbit / Alexa 486-488 Anti-mouse por 3 horas a temperatura ambiente, una vez finalizado el tiempo de incubación se realizarán lavados con PBS por 5 minutos seguido de un segundo lavado con agua destilada y finalmente las láminas serán montadas con resina sintética Vectashield y selladas con barniz de uñas. Se almacenarán a 4°C hasta su observación.

#### **4.7. Marcaje de extremos libres del DNA mediante TUNEL**

Se utilizará un kit In Situ Cell Death Detection de Roche. Los cortes histológicos serán hidratados por 5 minutos con PBS, posteriormente se incubarán con proteinasa K 20µg/ml en TRIS/HCl por 15 minutos a temperatura ambiente y lavados con PBS durante 5 minutos, posteriormente se permeabilizarán con tritón X-100 al 0.1% en citrato de sodio 0.1% y se mantendrán en refrigeración a 4°C durante 5 minutos, pasado este tiempo, las láminas serán lavadas con PBS y se incubarán con la mezcla de reacción TUNEL durante 60 minutos a 37°C. se realizará una tinción de contraste utilizando yoduro de propidio, se dejará incubar por 5 minutos y se lavará 3 veces con PBS, posteriormente se colocará el anticuerpo secundario Alexa 546 anti-mouse por 3 horas seguido de un lavado con agua destilada y finalmente las láminas serán montadas con resina sintética Vectashield y selladas con barniz de uñas. Se almacenarán a 4°C hasta su observación.

#### **4.8. Análisis del número de células positivas a Anexina V y TUNEL**



Las células positivas de Anexina V y TUNEL constituyen una fracción de volumen de la región cerebral analizada. Todas las imágenes serán digitalizadas utilizando una cámara de congelación MP, conectada a un microscopio de fluorescencia NIKON y se utilizará el software Image-Pro Plus 7, para analizar las imágenes y contar las células. El análisis de muerte neuronal se determinará mediante el método de conteo fraccionado (West, 1993). Este procedimiento consiste en contar neuronas en distintas secciones ópticas de una muestra sistemáticamente uniforme y estimar el número total de células muestreadas, este método se realizará en cortes de 14  $\mu\text{m}$ , los cuales serán montaron en serie. Para realizar el cálculo, se tomará la fracción de volumen de cada área de la muestra sistemáticamente aleatorizada de espacios visuales, los cuales cubren la región de interés en todas direcciones (X, Y Z) además de que permite la determinación de fracción de tejido en la que se contaron las neuronas.

#### **4.9. Análisis de electroencefalografía (EEG)**

Se iniciará el estudio colocando a las ratas en cajas de acrílico individuales para tomar lectura del EEG (EBNeuro B.E light, software database Galileo NT PMS). Después de 10 min de lectura basal se les inyectará el AK (Kainic Acid, SIGMA® laboratories) disuelto en solución salina (NaCl 0.9% Pisa® Farmacéutica Mexicana S.A. de C.V.) a una dosis de 10 mg/kg i. p. para inducir el modelo de epilepsia y se realizarán las lecturas del EEG durante 150 minutos más para ver la eficacia de los tratamientos (Choy, et al., 2010). 24 h después de la administración de AK se tomó lectura del EEG por 30 min (Kondratyev, et al., 2002; Vermoesen, et al., 2010). Para identificar la actividad eléctrica convulsiva (AEC) en el EEG se tomara en cuenta lo reportado por Kanamori y Ross (2011), ellos reportan que las convulsiones en el EEG se identifican como un periodo de cambios consistentes y repetitivos en amplitud y frecuencia de la actividad eléctrica que es claramente diferente a la actividad interictal que persiste por >10 s; Pitkänen y colaboradores, (2005) mencionan que la descarga debe durar al menos 5 s y la amplitud debe ser por lo menos dos veces más alta que VEEG basal.

#### **4.10. Análisis estadístico de los datos**

La estimación del tamaño de la muestra para este estudio experimental aleatorio y controlado se obtendrá por medio de la siguiente fórmula:

$$n = 2 \left[ \frac{(z_{\alpha} - z_{\beta})\sigma}{\mu_{\tau} - \mu_2} \right]^2$$

Donde n es el número de sujetos para cada grupo de tratamiento  $\mu_{\tau} - \mu_2$  es la diferencia detectable entre la media de los dos grupos,  $\sigma^2$ ,  $\mu_{\tau}$  y  $\mu_2$  es la desviación estándar común de cada grupo, y  $z_{\alpha}$   $z_{\beta}$  son los valores que incluyen alfa en las dos colas y beta en la cola inferior de la distribución normal estándar.  $\sigma^2$ ,  $\mu_{\tau}$  y  $\mu_2$  se estimarán con datos de un ensayo piloto. Posteriormente, se realizará un análisis exploratorio de los datos para determinar la existencia o no de una distribución normal aplicando la prueba de Kolmogorov-Smirnov y homogeneidad de varianzas aplicando la prueba de Levene. Una vez determinado esto, se utilizarán pruebas estadísticas paramétricas (ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Tukey), ANOVA de medidas repetidas o no paramétricas (Kruskal-Wallis) seguida de la U de Mann Whitney, los valores reportados se expresaron como el promedio  $\pm$  error estándar, en todos los casos se tomó como diferencia significativa un  $p < 0.05$ . Paquete estadístico SPSS 22.0.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 PET 18FDG**

En la valoración por micropet del modelo experimental de ácido kaínico en medición de 24 horas consecutivas, se observó un hipermetabolismo hipocampal bilateral a las primeras 2 horas de haber inyectado el ácido. Posteriormente se observa una caída exponencial del hipermetabolismo hacia hipometabolismo siendo esto significativo ( $P = 0,0001$ , la figura 2).

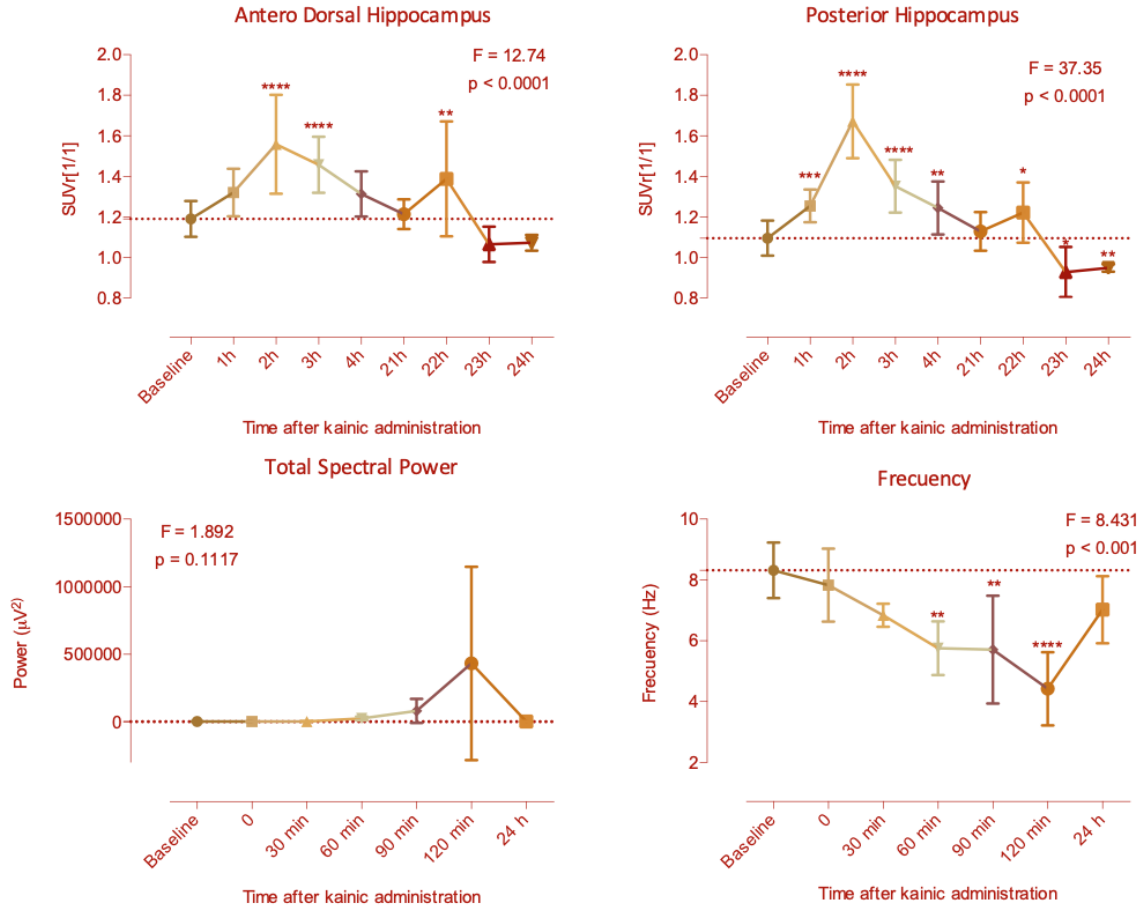


Figura 2 Medición de metabolismo PET 18FDG por 24 horas con ácido kaínico

En la valoración del micropet del modelo experimental de ácido kaínico de esclerosis mesial temporal donde se midió de forma indirecta el efecto de la dapsona a dosis de 12,5mg y 25 mg en un lapso de 24 horas se observó un hipermetabolismo a las 2 horas de administración del ácido kaínico, con una tendencia hacia normalizar el metabolismo en las dos dosis de dapsona en región hipocampal bilateral (Figura 3).

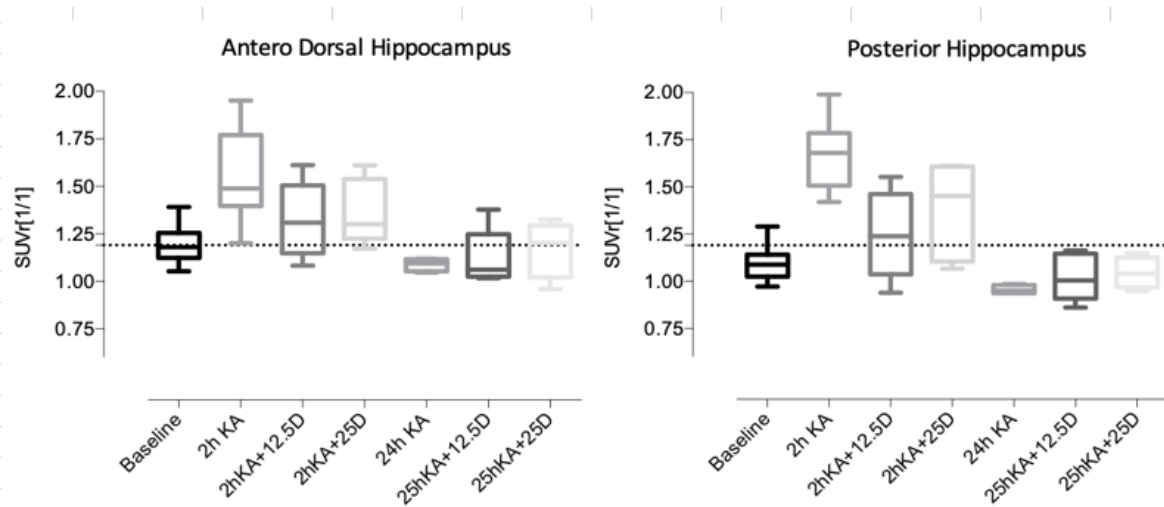
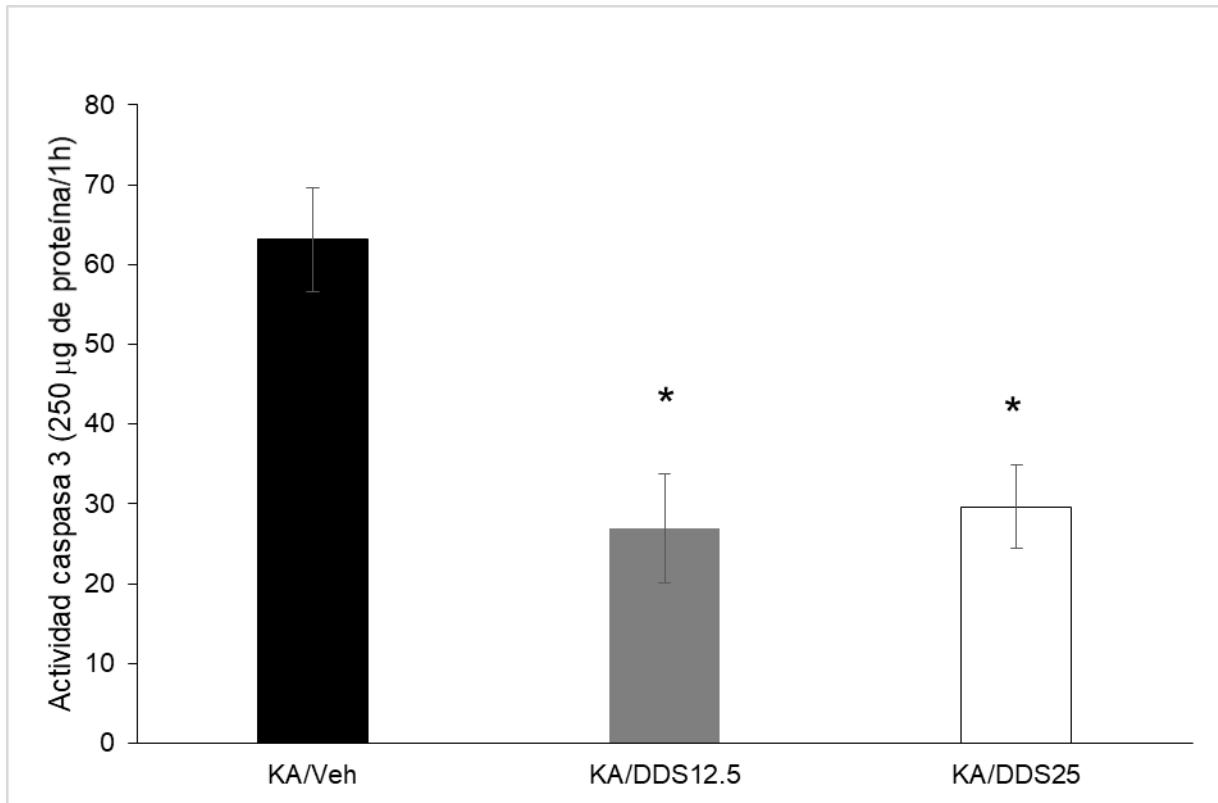


Figura 3 Medición de metabolismo PET 18FDG por 25 horas con ácido kaínico y dapsona.

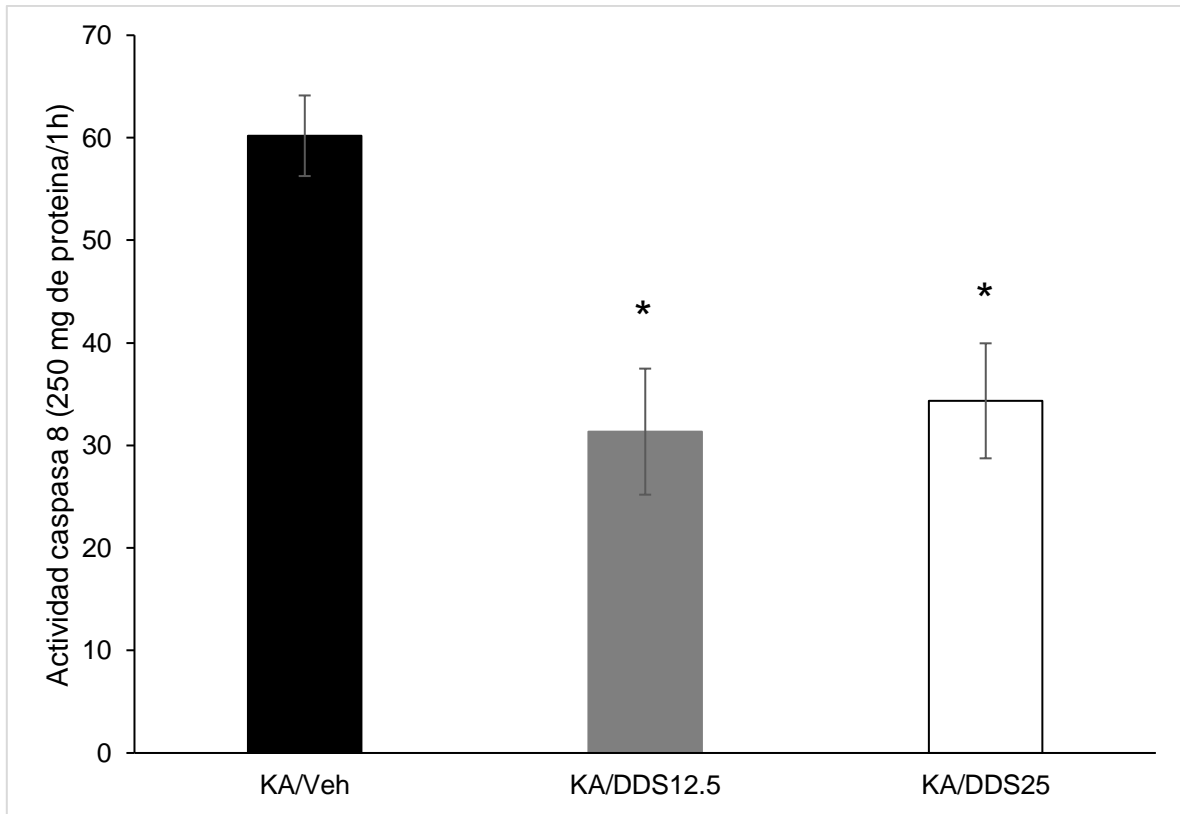
## 5.2 Análisis de actividad de caspasa 3 y 8.

En la valoración de actividad de caspasa 3 en la disección hipocámpal que se midió en el modelo de esclerosis mesial temporal con ácido kaínico en comparación con el de rescate con ácido kaínico más dapsona en dosis diferentes (12,5g vs 25mg), se demostró que existe una disminución en el nivel de caspasa 3 en el modelo de dapsona siendo significativo ( $p=0,02$ ), sin existir diferencias entre dosis de dapsona (Figura 5).



**Figura 3. Actividad de caspasa 3.**

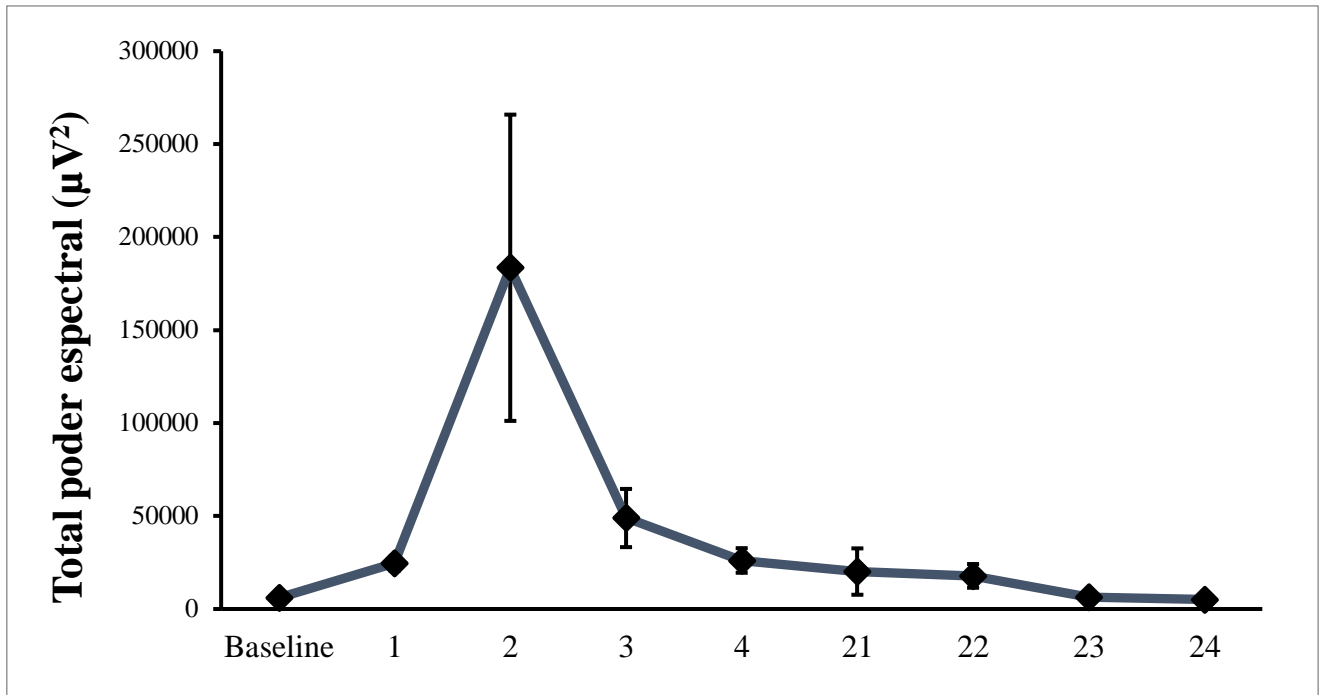
En la valoración del nivel de caspasa 8 en hipocampos de forma bilateral se mostró una reducción significativa con ambas dosis de dapsona, no habiendo entre ellas diferencia ( $p=0,002$ ) (Figura 6).



**Figura 6. Actividad de caspasa 8**

### **5.3 Análisis de vídeo electroencefalograma**

En la valoración del modelo de esclerosis mesial temporal inducida por ácido kaínico se observó en el análisis espectral una curva ascendente exponencial con pico máximo de actividad epiléptica a las 2 horas, disminuyendo paulatinamente hasta casi alcanzar la línea de base a las 24 horas de iniciado el modelo (Figura 7).



**Figura 7. Actividad epiléptica en un periodo de 24 horas.**

## 6. Discusión

El modelo animal de esclerosis mesial temporal inducido por ácido kaínico reproduce las características clínicas, neuropatológicas y electroencefalográficas que se observan en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal. En esta investigación, se observaron características similares de la PET de pacientes en ratas mostrando hipermetabolismo en el período ictal (fase aguda) e hipermetabolismo en el período interictal en los focos epileptogénicos, lo que hace que el modelo y la técnica de PET sean valiosos para evaluar nuevos tratamientos y sean útiles para dilucidar los tratamientos subyacentes (Sarıkaya 2015, Lévesque y cols., 2013, Lamarche y cols., 2016).

Publicaciones previas que han evaluado modelos inductores de crisis epilépticas y PET han demostrado hipometabolismo hipocampal bilateral 24 horas posteriores a la inducción, lo cual se asemeja a los hallazgos medidos en este trabajo de investigación. Sin embargo, con la evidencia previa no se ha descrito la medición del metabolismo cerebral durante las primeras 24 horas, solo se han realizado algunas mediciones por tiempo limitado (minutos) donde se ha encontrado hipermetabolismo hipocampal como lo ha demostrado en la presente investigación (Kornblum y cols., 2000; Schiffer y cols., 2006, Goffin y cols., 2009, Jupp y cols., 2012)

Aunque cuando el electroencefalograma (EEG) es la técnica convencional para medir y evaluar modelos de epilepsia en mamíferos, se obtiene una gran variabilidad en los datos registrados del EEG cuando son comparados con el análisis del PET de forma semicuantitativa. Siendo el PET una técnica que ofrece mayores ventajas en la evaluación y monitoreo de modelos en roedores inducidos por tóxicos, midiendo actividad de fármacos antiepilépticos in vivo. Otra ventaja del PET es el poder realizar de forma no invasiva múltiples test para probar diferentes modalidades de tratamientos. Además, existe una gran correlación de las mediciones de  $^{18}\text{F}$ FDG-PET y EEG (el hipermetabolismo en PET corresponde a una gran potencia espectral y baja frecuencia), hace que la imagen PET sea una excelente alternativa cuantitativa para las evaluaciones preclínicas.

El análisis semicuantitativo de  $^{18}\text{F}$ FDG-PET mostró un aumento consistente del metabolismo hipocampal de las ratas 2 horas después de la administración de ácido kaínico (PK-A), lo que hace que este tiempo sea idóneo para la evaluación temprana de modelos basados en ácido kaínico. Como se muestra en la figura 2 el área activa metabólica a las 2 horas P-KA cubre el hipocampo, lo que brinda la posibilidad de evaluar la influencia de los tratamientos in vivo en esta región. Otra posible ventaja de la cuantificación de PET en la fase aguda (2 horas) después de la inyección de ácido kaínico es que las diferencias en la captación de FDG en este momento son mayores en comparación con las evaluaciones basales y tardías (24 horas), pudiendo detectar cambios mínimos debido a tratamientos que no son evidentes en las evaluaciones tardías.

A las 22 horas después de la administración de ácido kaínico, se observó una segunda fase hipermetabólica y se midió por PET con actividad principal en el hipocampo antero dorsal en comparación con el hipocampo posterior (figura 2, gráficos superiores). La actividad principal en el hipocampo antero dorsal se debe a que esta segmentación anatómica incluye CA3, región ampliamente reportada como afectada en el modelo animal de ácido kaínico.

A las 24 horas después de la administración de ácido kaínico se observó un hipometabolismo por debajo de la línea de base que fue significativo. Lo cual describe un modelo idóneo de 24 horas críticas en el hipocampo donde se pudiera realizar alguna intervención in vivo.



En la segunda fase del estudio se evaluó el efecto de dapsona en el modelo de ácido kaínico evaluado por 18FDG-PET observándose un hipermetabolismo a las 2 horas de haberse realizado el modelo, sin embargo se observa una tendencia hacia normalizar el metabolismo en la imagen de PET después de 25 horas. Lo cual sugiere que la actividad de la dapsona pudiera estar actuando durante las primeras 24 horas, midiéndose de forma indirecta por este método su efecto neuroprotector.

Posteriormente para valorar el efecto anti-apoptosis de la dapsona en el modelo de esclerosis mesial temporal inducida por ácido kaínico, se realizó la medición de caspasa 3 y 8 demostrando de forma contundente y significativa la disminución de la apoptosis en las ratas tratadas con dapsona en dosis de 12,5mg y 25mg en comparación con las que recibieron solo ácido kaínico. Lo cual demuestra el efecto neuroprotector y probablemente anticonvulsivo de la dapsona en este modelo en particular. Además se compararon las dosis de dapsona si existía alguna diferencia de dosis, sin encontrar significancia de la dosis.

## **Conclusiones**

Después de muchas décadas de estudios neurobiológicos de la epilepsia, sigue siendo conocida debido su presentación complicada y las redes morfológicas. Los estudios de imágenes moleculares PET en combinación con estudios farmacológicos pueden ser útiles en el futuro para dilucidar algunos de los procesos metabólicos en todo el cerebro evaluados en diferentes fases de la enfermedad, aprovechando modelos animales como el modelo ácido kaínico, siendo más fácil de implementar en comparación con modelos inducidos por lesión.

La adquisición de imágenes con 18FDG-PET es un método confiable y confiable para cuantificar los cambios metabólicos del modelo de rata de esclerosis mesial temporal inducida por ácido kaínico en la es útil para obtener datos en cualquier fase: aguda, postaguda y a largo plazo. El 18FDG-PET se correlacionó con el EEG, lo que permite la evaluación del modelo ácido kaínico in vivo, no invasivo, útil en la evaluación de nuevas terapias. Otra ventaja es la capacidad de hacer un seguimiento de la misma rata a lo largo del tratamiento y dejar que el animal esté disponible para ser evaluado por otras técnicas.

Este estudio demostró la validación del PET en el modelo de esclerosis mesial temporal inducido por ácido kaínico. Siendo este método de utilidad para demostrar cambios

metabólicos inducidos por kaínico. Ya construido este modelo también demostró ser eficaz para evaluar el efecto de la dapsona en las primeras 25 horas de haber realizado el modelo.

## 7. REFERENCIAS

Altagracia M, Monroy-Noyola A, Osorio-Rico L, Kravzov J, Alvarado-Calvillo R, Manjarrez-Marmolejo J, Ríos C. Dapsone attenuates kainic acid-induced seizures in rats. *Neurosci Lett*. 1994 Jul 18;176(1):52-4.

Bertoglio D, Verhaeghe J, Dedeurwaerdere S, Gröhn O. Neuroimaging in animal models of epilepsy. *Neuroscience*. 2017 Sep 1;358:277-299.

Choy M, Wells JA, Thomas DL, Gadian DG, Scott RC, Lythgoe MF. Cerebral blood flow changes during pilocarpine-induced status epilepticus activity in the rat hippocampus. *Exp Neurol*. 2010 Sep;225(1):196-201.

Depaulis A, Hamelin S. Animal models for mesiotemporal lobe epilepsy: The end of a misunderstanding? *Rev Neurol (Paris)*. 2015 Mar;171(3):217-26.

Devinsky O, Vezzani A, O'Brien TJ, Jette N, Scheffer IE, de Curtis M, Perucca P. Epilepsy. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 May 3;4:18024.

Diaz-Ruiz A, Mendez-Armenta M, Galván-Arzate S, Manjarrez J, Nava-Ruiz C, Santander I, Balderas G, Ríos C. Antioxidant, anticonvulsive and neuroprotective effects of dapsone and phenobarbital against kainic acid-induced damage in rats. *Neurochem Res*. 2013 Sep;38(9):1819-27.

Falcón-Moya R, Sihra TS, Rodríguez-Moreno A. Kainate Receptors: Role in Epilepsy. *Front Mol Neurosci*. 2018 Jun 22;11:217.

Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B. Seizure-induced neuronal necrosis: implications for programmed cell death mechanisms. *Epilepsia*. 2000;41 Suppl 6:S9-13.

Goffin K, Van Paesschen W, Dupont P, Van Laere K. Longitudinal microPET imaging of brain glucose metabolism in rat lithium-pilocarpine model of epilepsy. *Exp Neurol*. 2009 May;217(1):205-209

Jefferys J, Steinhäuser C, Bedner P. Chemically-induced TLE models: Topical application. *J Neurosci Methods*. 2016 Feb 15;260:53-61.

Juárez-Nájera, A., Rios-Castañeda, C., Diaz-Ruiz, A., Arroyo-Rios, E., Villegas-Ronquillo, A., Flores-Hernandez, J., 2015. Effect of dapsone on NMDA receptor subunits: GluN2A and GluN2B in pyramidal neurons from rat primary motor cortex. *Society for Neuroscience* 206, 14/A76.

Jupp B, Williams J, Binns D, Hicks RJ, Cardamone L, Jones N, Rees S, O'Brien TJ. Hypometabolism precedes limbic atrophy and spontaneous recurrent seizures in a rat model of TLE. *Epilepsia*. 2012 Jul;53(7):1233-44.

Kahn G. Dapsone is safe during pregnancy. *J Am Acad Dermatol*. 1985 Nov;13(5 Pt 1):838-9.

Kanamori K, Ross BD. Chronic electrographic seizure reduces glutamine and elevates glutamate in the extracellular fluid of rat brain. *Brain Res*. 2011 Jan 31;1371:180-91.

Kandratavicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, Bueno-Junior LS, Leite JP. Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2014 Sep 9;10:1693-705.

Kondratyev A, Selby D, Gale K. Status epilepticus leads to the degradation of the endogenous inhibitor of caspase-activated DNase in rats. *Neurosci Lett*. 2002 Feb 22;319(3):145-8.

Kornblum HI, Araujo DM, Annala AJ, Tatsukawa KJ, Phelps ME, Cherry SR. In vivo imaging of neuronal activation and plasticity in the rat brain by high-resolution positron emission tomography (microPET). *Nat Biotechnol*. 2000 Jun;18(6):655-660

Lamarche F, Job AS, Deman P, Bhattacharjee M, Hoffmann D, Gallazzini-Crépin C, Bouvard S, Minotti L1, Kahane P, David O. Correlation of FDG-PET hypometabolism and SEEG epileptogenicity mapping in patients with drug-resistant focal epilepsy. *Epilepsia*. 2016 Dec;57(12):2045-2055

Lévesque M, Avoli M, Bernard C. Animal models of temporal lobe epilepsy following systemic chemoconvulsant administration. *J Neurosci Methods*. 2016 Feb 15;260:45-52.

Lévesque M, Avoli M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013 Dec;37(10 Pt 2):2887-99. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.10.011.

López-Gómez M, Corona T, Diaz-Ruiz A, Ríos C. Safety and tolerability of dapsone for the treatment of patients with drug-resistant, partial-onset seizures: an open-label trial. *Neurol Sci.* 2011 Dec;32(6):1063-7.

Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure.* 2011 Jun;20(5):359-68.

Nirwan N, Vyas P, Vohora D. Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy: a narrative review. *Rev Neurosci.* 2018 Sep 25;29(7):757-770.

Pitkänen A, Kharatishvili I, Narkilahti S, Lukasiuk K, Nissinen J. Administration of diazepam during status epilepticus reduces development and severity of epilepsy in rat. *Epilepsy Res.* 2005 Jan;63(1):27-42.

Raol YH, Brooks-Kayal AR. Experimental models of seizures and epilepsies. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012;105:57-82.

Reddy DS, Kuruba R. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *Int J Mol Sci.* 2013 Sep 5;14(9):18284-318.

Rios C, Altagracia M, Kravzov J, Monroy-Noyola A, Alvarado-Calvillo R, Manjarrez-Marmolejo J, Osorio-Rico L. EEG evaluation of the anticonvulsive effect of dapsone in the kainic acid model of epilepsy. *Proc West Pharmacol Soc.* 1993;36:259-61.

Rodríguez E, Méndez-Armenta M, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Barroso-Moguel R, Rodríguez F, Ríos C, Santamaría A. Dapsone prevents morphological lesions and lipid peroxidation induced by quinolinic acid in rat corpus striatum. *Toxicology.* 1999 Nov 29;139(1-2):111-8.

Santamaría A, Ordaz-Moreno J, Rubio-Osornio M, Solís-Hernández F, Ríos C. Neuroprotective effect of dapsone against quinolinate- and kainate-induced striatal neurotoxicities in rats. *Pharmacol Toxicol.* 1997 Dec;81(6):271-5.

Sarikaya I PET studies in epilepsy. *Am J Nucl Med Mol Imaging.* 2015 Oct 12;5(5):416-30

Schiffer WK, Mirrione MM, Biegon A, Alexoff DL, Patel V, Dewey SL. Serial microPET measures of the metabolic reaction to a microdialysis probe implant. *J Neurosci Methods*. 2006 Sep 15;155(2):272-284

Scott Brady George Siegel R. Wayne Albers Donald. *PriceBasic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 7th Edition. Academic Press

Vermoesen K, Smolders I, Massie A, Michotte Y, Clinckers R. The control of kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res*. 2010 Jun;90(1-2):164-6.

West Adrian K., Juan Hidalgo, Donnie Eddins, Edward D. Levin, and Michael Aschner *Metallothionein in the central nervous system: roles in protection, regeneration and cognition Neurotoxicology*. 2008 May ; 29(3): 488-502.

Yang J, He F, Meng Q, Sun Y, Wang W, Wang C. Inhibiting HIF-1 $\alpha$  Decreases Expression of TNF- $\alpha$  and Caspase-3 in Specific Brain Regions Exposed Kainic Acid-Induced Status Epilepticus. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38(1):75-82.