



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SEDE SUR**

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**“Evaluación del Efecto Neuroprotector del Propilparabeno en
Ratas Sometidas a *Status Epilepticus* por el Modelo de Litio-
Pilocarpina”**

Tesis que presenta

M. en C. César Emmanuel Santana Gómez

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias en
Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Directoras de Tesis:

**Dra. Luisa L. Rocha Arrieta
Dra. Sandra A. Orozco Suárez**

Ciudad de México

Febrero 2017

*Sólo porque algo no haga lo que
era previsto no quiere decir que
sea inútil el esfuerzo.*

Thomas Alva Edison

La presente investigación se realizó en el laboratorio No. 8 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. (CINVESTAV, Sede Sur) bajo la dirección de la Dra. Luisa L. Rocha Arrieta. Con el apoyo de la Dra. Sandra A. Orozco Suárez, de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS.

Durante la elaboración de esta tesis se contó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de doctorado número 243430, proyecto 220365 y proyecto de cooperación bilateral 189545. También se contó con el apoyo del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con la beca número 99096420. Además del apoyo del Centro Internacional de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos de América (Fogarty NIH, proyecto R21TW009384) y del proyecto de colaboración UC Mexus-Conacyt.

Dedicatorias

El presente trabajo y todo el esfuerzo realizado en cada meta de mi vida se los dedico a mis padres, por ser esa gran inspiración y enseñarme que los sueños son metas que solo trabajando se pueden cumplir. Por ser ese gran ejemplo de fortaleza y dedicación en todos los aspectos de la vida.

A mi hermano Daniel Santana

Por su cariño sencillez y amor incondicional. Eres una gran inspiración.

A mi esposa Ileri Franco

Por ser mi inspiración de vida. Gracias por estar conmigo, por tu amor, comprensión y por siempre darme un poco más de lo que merezco.

Agradecimientos

A la **Dra. Luisa Rocha** por su apoyo incondicional en cada una de las etapas de este proyecto. Gracias por todas las enseñanzas que día a día me demostraban que no me equivoque al elegir mentor. Estoy seguro que aprendí de la mejor.

A la **Dra. Sandra Orozco** por permitirme seguir con este proyecto y abrirme las puertas de su laboratorio de investigación, por su disposición y entrega en cada una de las actividades realizadas. Gracias por siempre estar ahí.

A la **Dra. Manola Cuéllar Herrera** por su amistad, conocimientos y dedicación en la revisión de esta tesis.

Al **Dr. Enrique Hong Chong** por sus acertados comentarios para la mejora de este trabajo.

Al **Dr. Emilio Galván Espinosa** por su apoyo y comentarios realizados lo largo de mi formación.

Al **Dr. Alonso Fenández Guasti** por sus valiosas contribuciones que sin duda fueron esenciales para la mejora de este trabajo.

Al **Dr. Luis Bruno Blanch** por su amabilidad, paciencia y disponibilidad para compartir su experiencia y amplio conocimiento acerca de la identificación del compuesto estudiado en esta tesis.

Al **Dr. Alan Talevi** por contagiarme de esa pasión por la ciencia.

Al **Dr. Walter Besio** por su apoyo y amistad. Gracias por las experiencias y momentos compartidos.

Al **Dr. Claude Wasterlain** por enseñarme que un gran investigador se distingue por su sencillez y humildad.

Al **Dr. Jerome Niquet** por demostrarme que la ciencia se disfruta más si la hacemos con alegría.

Al **Dr. Víctor Madrigal** por su incondicional ayuda. Gracias por transmitirme esa pasión por los registros electrográficos.

A la **Q.F.B. Leticia Neri Bazán** por cada consejo, momento y sonrisa compartida.

A la **Q.F.I. Francia Carmona** por su amistad y por estar siempre de pie ante cualquier adversidad.

A **Carmen Baltazar** por su amistad, cariño y apoyo profesional.

Al **Lic. Héctor Vázquez Espinoza** por su amistad y compartir esas charlas tan amenas. Además, de su invaluable ayuda en la obtención de material bibliográfico.

Al **Ing. José Rodolfo Fernández Calderón** por su amabilidad y disposición para ayudarme.

A mi gran amigo **Q.F.B. Christian Figueroa Flores** por su sencillez y enseñarme a ver más allá de la apariencia de cada persona. Gracias por el apoyo en la realización de esta tesis consiguiendo algunos insumos esenciales para la misma.

A mis amigos **Dra. Ivette Bañuelos, Dr. Leonardo Lara, Dra. Karla Alina y Dr. Daniel Cervantes** por cada momento compartido, por su incondicional amistad y por ser parte de esta gran historia. Sin ustedes nada de esto sería igual.

A mis compañeros (as) de laboratorio:

Argelia Rosillo, Cecilia Zavala, David Alcántara, Guadalupe Valle, Nabila Saleh, Ángeles Lumbreras, Angélica Vega, Víctor Navarrete, Monserrat Flores, por esas pláticas, congresos, seminarios y pasteles compartidos. Agradezco a cada uno de ustedes por compartir las alegrías, tristezas y logros obtenidos durante este camino. Les deseo el mejor de los éxitos y sé que en algún momento la vida científica nos volverá a encontrar. Créanme que será un verdadero honor continuar trabajando con ustedes.

I. Índice general

I. Índice general.....	i
II. Índice figuras	iv
III. Abreviaturas	vi
IV. Resumen	viii
V. Abstract	ix
1. Introducción	1
1.1 Epilepsia.....	1
1.1.1 Definición.....	1
1.1.2 Fisiopatología	1
1.1.3 Etiología	2
1.1.4 Epidemiología.....	2
1.1.5 Repercusiones sociales y económicas.....	3
1.1.6 Comorbilidades de la epilepsia.....	3
1.1.7 Epilepsia de lóbulo temporal	5
1.1.7.1 Causas de la ELT	5
1.2 Status Epilepticus	5
1.2.1 Definición.....	5
1.2.2 Clasificación del <i>SE</i>	6
1.2.3 Consecuencias del <i>SE</i>	6
1.2.3.1 Epileptogénesis.....	7
1.2.3.1.1 Incremento en la liberación de glutamato.....	7
1.2.3.1.2 Daño neuronal.....	9
1.2.3.1.3 Neurogénesis	10
1.2.3.1.4 Gliosis.....	11
1.2.3.1.5 Rearborización o crecimiento axonal.....	12
1.2.3.1.6 Daño a la BHE.....	13
1.2.3.1.7 Actividad eléctrica de alta frecuencia	13
1.2.4 Modelos animales de <i>SE</i>	14
1.2.4.1 Modelo de Pilocarpina y Litio-Pilocarpina	15
1.2.4.2 Modelo del Ácido Kaínico	16
1.2.4.3 Modelo de Estimulación Eléctrica	17
1.2.5 Tratamiento farmacológico del <i>SE</i>	18
1.2.5.1 Levetiracetam	19
1.2.5.1.1 Mecanismo de acción.....	20
1.2.6 Búsqueda de nuevos FAE.....	21
1.2.6.1 Ventajas del “ <i>Screening</i> ” virtual	22
1.2.6.1.1 Propilparabeno	23
1.2.6.1.1.1 Mecanismo de acción.....	24
1.2.6.1.1.2 PPB y modelos de crisis convulsivas	24
1.2.6.1.1.3 Efectos adversos del PPB	24
2. Justificación.....	26
3. Hipótesis.....	26
4. Objetivos	27

4.1	Objetivo general	27
4.2	Objetivos particulares	27
4.2.1	Objetivo 1	27
4.2.2	Objetivo 2	27
4.2.3	Objetivo 3	27
5.	Metodología general	28
5.1	Animales	28
5.2	Cirugía	28
5.3	Inducción del SE	29
5.4	Experimento de microdiálisis	29
5.5	Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	30
5.6	Evaluación de la actividad electrográfica hipocampal	30
5.7	Evaluación de la excitabilidad hipocampal	31
5.8	Análisis histológico	32
5.8.1	Perfusión	32
5.8.2	Evaluación del tejido cerebral	32
5.8.2.1	Tinción de Nissl	33
5.8.2.2	Tinción de Fluoro-Jade B	33
5.8.2.3	Inmunofluorescencia para NeuN-GFAP-DAPI	34
5.8.2.4	Cuantificación celular	34
6.	Experimentos	36
6.1	Experimento 1: Evaluación de los efectos del PPB en las consecuencias a corto plazo inducidas por el SE	36
6.1.1	Metodología	36
6.1.1.1	Grupo SE-PPB178	36
6.1.1.2	Grupo SE-PEG (vehículo)	37
6.1.1.3	Grupo control	37
6.1.2	Resultados	38
6.1.2.1	Grupo control	38
6.1.2.2	Grupo SE-PEG	40
6.1.2.3	Grupo SE-PPB178	43
6.1.3	Discusión	47
6.2	Experimento 2: Evaluación de los efectos del PPB y su combinación con LEV en las consecuencias a largo plazo inducidas por el SE	50
6.2.1	Metodología para la evaluación del efecto de distintas dosis de PPB en las consecuencias a largo plazo inducidas por el SE	50
6.2.1.1	Grupo CRE-PPB178	50
6.2.1.2	Grupo CRE-PPB90	51
6.2.1.3	Grupo CRE-PEG	52
6.2.2	Resultados	52
6.2.2.1	Grupo CRE-PEG	52
6.2.2.2	Grupo CRE-PPB90	55
6.2.2.3	Grupo CRE-PPB178	56
6.2.3	Metodología para la evaluación de los efectos de la combinación de dosis subefectivas de PPB con LEV en las consecuencias a largo plazo inducidas por el SE	60

6.2.3.1	Grupo CRE-PPB-LEV	60
6.2.3.2	Grupo CRE-LEV	61
6.2.4	Resultados	61
6.2.4.1	Grupo CRE-LEV	61
6.2.4.2	Grupo CRE-PPB-LEV	64
6.2.5	Discusión	66
6.3	Experimento 3: Evaluación de los efectos tóxicos inducidos por la administración subcrónica de PPB y su combinación con LEV	71
6.3.1	Metodología general	71
6.3.1.1	Prueba de campo abierto	71
6.3.1.2	Evaluación del tejido renal y hepático	71
6.3.1.2.1	Tinción de hematoxilina-eosina	72
6.3.1.2.2	Tinción de rojo oleoso	72
6.3.2	Metodología para la evaluación de los efectos en la actividad motora, daño renal y hepático de ratas sanas inducidos por la administración subcrónica de PPB y su combinación con LEV	73
6.3.2.1	Grupos PPB	73
6.3.2.2	Grupo LEV	74
6.3.2.3	Grupos PPB-LEV	74
6.3.2.4	Grupo control	74
6.3.3	Resultados	74
6.3.3.1	Grupo control	74
6.3.3.2	Grupos tratados con PPB	75
6.3.3.3	Grupo LEV	77
6.3.3.4	Grupos PPB-LEV	78
6.3.4	Metodología para la evaluación de la recuperación hepática después de la administración subcrónica de PPB	79
6.3.4.1	Administración subcrónica de PPB	80
6.3.5	Resultados	80
6.3.5.1	Administración subcrónica de PPB	80
6.3.6	Discusión	81
7.	Conclusiones	84
8.	Perspectivas	85
9.	Referencias	86
Anexo	111

II. Índice figuras

Figura 1. Alteraciones neuronales durante el proceso de epileptogénesis.	9
Figura 2. Estructura molecular del propilparabeno y levetiracetam	21
Figura 3. Protocolo experimental utilizado para determinar los efectos del PPB en el período post-SE.....	36
Figura 4. Evaluación histológica de la trayectoria del electrodo bipolar y cánula de microdiálisis.....	38
Figura 5. Representación tiempo-frecuencia del espectro de potencia (0.1-250 Hz) y actividad electrográfica hipocampal bajo distintas condiciones experimentales.	40
Figura 6. Análisis espectral de la actividad eléctrica del hipocampo bajo condiciones basales, 5 min después del establecimiento del SE, así como 1 h después de la administración de PEG o PPB	42
Figura 7. Liberación de glutamato en condiciones basales, durante el SE y después del tratamiento con vehículo o PPB	43
Figura 8. Microfotografías representativas de secciones coronales de hipocampo dorsal a nivel de hilus, evaluadas 24 h después del SE. Tinciones de Nissl y Fluoro-Jade B e inmunohistoquímica para NeuN-DAPI.....	44
Figura 9. Preservación y daño neuronal en las regiones dorsal y ventral del hipocampo, evaluado 24 h después del SE	46
Figura 10. Protocolo experimental para la evaluación de los efectos del PPB en las consecuencias a largo plazo inducidas por el SE	50
Figura 11. Evaluación de los cambios en la actividad electrográfica durante el periodo interictal de animales tratados con PEG o PPB a distintas dosis	53
Figura 12. Liberación de glutamato en el hipocampo de ratas control y durante el período interictal de animales con CRE	54
Figura 13. Valores de UPD en condiciones control y durante el período interictal de animales con CRE.....	55
Figura 14. Evaluación de la preservación neuronal y gliosis hipocampal durante el período crónico del modelo de SE	57
Figura 15. Evaluación del daño neuronal en el hipocampo dorsal y ventral durante el período crónico del modelo de SE.	58
Figura 16. Protocolo experimental para la evaluación de los efectos de la combinación de PPB y LEV en las consecuencias a largo plazo inducidas por el SE.....	60
Figura 17. Actividad electrográfica del hipocampo durante el período interictal de animales con CRE tratados con LEV o la combinación PPB-LEV.....	62
Figura 18. Liberación de glutamato en el hipocampo de ratas tratadas con LEV o la combinación PPB-LEV.....	63
Figura 19. Valores de UPD durante el período interictal de animales con CRE tratados de manera subcrónica con LEV o la combinación PPB-LEV.....	64

Figura 20. Evaluación del daño neuronal en el hipocampo durante el periodo interictal de animales administrados con LEV o la combinación PPB-LEV.....	65
Figura 21. Protocolo experimental para la evaluación de los cambios en la actividad motora, daño renal y hepático, inducido por la administración subcrónica de PPB y su combinación con LEV en ratas sanas.....	73
Figura 22. Evaluación de la actividad motora media hora después del tratamiento con PPB, LEV o la combinación PPB-LEV.....	75
Figura 23. Evaluación de la actividad motora 23 h después de la administración repetida de PPB y su combinación con LEV.....	76
Figura 24. Microfotografías representativas de tejido renal evaluado mediante la tinción de hematoxilina-eosina 6 días después de la administración subcrónica de distintas dosis de PPB y su combinación con LEV.....	77
Figura 25. Microfotografías representativas de tejido hepático evaluado mediante la tinción hematoxilina-eosina 6 días después de la administración subcrónica de distintas dosis de PPB y su combinación con LEV.....	78
Figura 26. Microfotografías representativas de la tinción de rojo oleoso en el tejido hepático evaluado 6 días después de la administración subcrónica de distintas dosis de PPB y su combinación con LEV.....	79
Figura 27. Protocolo experimental para la evaluación del tejido hepático 30 días después de la administración diaria de PPB.....	80
Figura 28. Microfotografías representativas de la evaluación histológica del tejido hepático mediante las tinciones de hematoxilina-eosina y rojo oleoso, evaluadas 30 días después del tratamiento subcrónico con PPB.....	81

III. Abreviaturas

°C	Grados centígrados
λ	Longitud de onda
μ A	Microamperios
μ l	Microlitro
μ m	Micrómetro
μ M	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AK	Ácido kaínico
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ARN	Ácido ribonucleico
asf	Área evaluada
ATP	Adenosín trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (<i>siglas en inglés</i>)
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>siglas en inglés</i>)
C ₁₈	Carbono 18
CA1	Cuerno de Ammon área 1
Ca ²⁺	Calcio
CA3	Cuerno de Ammon área 3
CRE	Crisis recurrentes espontáneas
Da	Dalton
DAPI	Dihidrocloruro de 4,6-diamino-2-fenilindol (<i>siglas en inglés</i>)
DZP	Diazepam
EAAT	Transportador de amino ácidos excitatorios (<i>siglas en inglés</i>)
EE	Error estándar
ELT	Epilepsia de lóbulo temporal
FAE	Fármaco antiepiléptico
g	Gramos
GABA	Ácido γ -aminobutírico (<i>siglas en inglés</i>)
GD	Giro dentado
GFAP	Proteína fibrilar glial (<i>siglas en inglés</i>)
h	Horas
<i>h</i>	Altura del disector
HClO ₄	Ácido perclórico
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución (<i>siglas en inglés</i>)
Hz	Hertz
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal

ILAE	Liga Internacional Contra la Epilepsia (<i>siglas en inglés</i>)
K ⁺	Potasio
kg	Kilogramo
LEV	Levetiracetam
M	Molar
meq	Miliequivalente
mg	Miligramo
mGluR	Receptor metabotrópico a glutamato
min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mosm	Miliosmolaridad
ms	Milisegundo
N	Normalidad
Na ⁺	Sodio
ND	No determinado
NeuN	Proteína neuronal nuclear (<i>siglas en inglés</i>)
nm	Nanómetro
NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPA	Orto-ftaldialdehído
p. ej.	Por ejemplo
PBS	Buffer de fosfatos (<i>siglas en inglés</i>)
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de Hidrógeno
PPE	Programa Prioritario de Epilepsia
PPB	Propilparabeno
Q ⁻	Número de células positivas
s	Segundos
s.c.	Subcutáneo
SE	<i>Status Epilepticus</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
ssf	Fracción de muestreo
SV	“ <i>Screening</i> ” virtual
SV2A	Proteína vesicular sináptica 2A (<i>siglas en inglés</i>)
t	Espesor del corte
TRF	Transformada rápida de fourier
UPD	Umbral post-descarga
VC	Vena centrolobulillar
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (<i>siglas en inglés</i>)

IV. Resumen

El propilparabeno (PPB) es un antimicrobiano ampliamente utilizado que bloquea canales de Na⁺ dependientes de voltaje en células piramidales de CA1, así como en cultivos de cardiomiocitos de rata. Sin embargo, se desconoce si la administración aguda y subcrónica de PPB solo y en combinación con un fármaco antiepiléptico (FAE) modifica la liberación de glutamato, hiperexcitabilidad y gliosis hipocampal, en ratas sometidas a *Status Epilepticus* (SE). Inicialmente, se investigaron los efectos de la administración única de PPB después del SE. El grupo de animales tratados con diazepam (DZP) más PPB presentó una disminución en la liberación de glutamato en el hipocampo (126%, $p < 0.001$; 30 min después del tratamiento). Efecto que se asoció con un incremento en la actividad neuronal de baja frecuencia ($p < 0.001$), disminución de las oscilaciones en las bandas 30-250 Hz ($p < 0.001$) y menor daño neuronal en el hipocampo (evaluado 24 h después del SE), en comparación con las ratas que recibieron DZP más vehículo después del SE. Posteriormente, se evaluó si la administración subcrónica de PPB y su combinación con levetiracetam (LEV, un FAE de amplio espectro utilizado para el tratamiento de la epilepsia) durante el período post-SE, previene las consecuencias a largo plazo inducidas por la actividad epiléptica asociada al SE. En comparación con los animales que fueron tratados de forma subcrónica con vehículo después del SE, las ratas administradas con PPB (178 mg/kg, i.p.) durante 5 días presentaron una disminución en la excitabilidad neuronal, liberación interictal de glutamato y gliosis, así como un efecto neuroprotector selectivo de las células granulares de giro dentado evaluado durante la etapa crónica del modelo (30 días post-SE). Por otra parte, en los animales administrados con la combinación PPB-LEV se observó una disminución en el daño neuronal y en la liberación de glutamato (con respecto a las ratas tratadas solo con LEV o PPB). Finalmente, se evaluaron los efectos tóxicos inducidos por la administración subcrónica de distintas dosis de PPB y su combinación con LEV. Únicamente la dosis de 178 mg/kg, (i.p.) de PPB indujo cambios en la histología hepática y actividad motora evaluada mediante la prueba de campo abierto. Estos cambios se revirtieron después de suspender el tratamiento. Los resultados indican que el PPB solo o en combinación con un FAE podría representar una alternativa terapéutica para reducir las consecuencias de la actividad epiléptica inducida durante el SE.

V. Abstract

Propylparaben (PPB) is an antimicrobial widely used that blocks voltage-dependent Na⁺ channels in rats CA1 pyramidal cells as well as in cardiomyocyte cultures. However, it's not known if the acute and subchronic administration of PPB alone and in combination with an antiepileptic drug (AED) modifies the glutamate release, hyperexcitability and hippocampal gliosis in rats subjected to *Status Epilepticus* (SE). Initially, the effects of a single administration of PPB after SE were investigated. The results showed that animals treated with diazepam (DZP) plus PPB had a decrease in hippocampal glutamate release (126%, $p < 0.001$; 30 min after treatment). This effect was associated with an increase in low frequency neuronal activity ($p < 0.001$), decreased oscillations in the 30-250 Hz bands ($p < 0.001$), and reduction of neuronal damage in hippocampus (evaluated 24 h after SE), compared with rats receiving DZP plus vehicle after SE. The subsequent experiment, examined if the subchronic PPB administration and its combination with levetiracetam (LEV, a broad-spectrum AED used for epilepsy treatment) during the post-SE period prevent the long-term consequences induced by the seizure activity associated with SE. Compared to animals that were synchronously treated with vehicle after SE, the rats administered with PPB (178 mg / kg, i.p.) for 5 days had a decrease in neuronal excitability, interictal glutamate release and gliosis, as well as selective neuroprotective effect in dentate gyrus granule cells evaluated during the chronic period of the model (30 days post-SE). On the other hand, in the animals administered with the PPB-LEV combination a decrease in neuronal damage and glutamate levels was observed (compared to rats treated only with LEV or PPB). Finally, the toxic effects induced by the subchronic administration of different PPB doses and PPB-LEV combination were evaluated. Only the 178 mg/kg (i.p.) dose of PPB induced changes in the liver histology and motor activity assessed by the open field test. These changes were reversed after treatment cessation. The results indicate that PPB alone or associated with an AED could represent a therapeutic alternative to reduce the consequences of seizure activity induced during SE.

1. Introducción

1.1 Epilepsia

1.1.1 Definición

La palabra epilepsia se deriva del verbo griego ἐπιληψία (*epilamvanein*) que significa "ser atacado". En la antigua Grecia la gente hablaba de "ser atacado" y de haber tenido un "ataque". Esta terminología se derivó de la noción de que todas las enfermedades son representadas usualmente como ataques de los dioses o espíritus malignos (Engel y Pedley, 1997). De acuerdo a la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE, *por sus siglas en inglés*), la epilepsia se define como un trastorno cerebral que se caracteriza por la predisposición a generar crisis epilépticas, así como las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales asociadas a esta condición (Fisher et al., 2005).

1.1.2 Fisiopatología

Desde el punto de vista fisiopatológico las crisis epilépticas son producidas por descargas sincrónicas anormales y excesivas de subgrupos neuronales. La sincronización anormal es generada por el incremento de la neurotransmisión excitatoria mediada principalmente por el neurotransmisor glutamato y la reducción de la neurotransmisión inhibitoria mediada por el ácido γ -aminobutírico (GABA, *por sus siglas en inglés*) (Bradford, 1995). Las características de las crisis epilépticas son variables y dependen de la zona del cerebro en la que se origina el trastorno, así como de su propagación. Durante las crisis epilépticas pueden producirse síntomas transitorios como arresto conductual o pérdida del conocimiento, trastornos del movimiento y de

los sentidos (en particular alteraciones en la visión, audición y el gusto), así como alteraciones del humor o de otras funciones cognitivas (Engel, 2001).

1.1.3 Etiología

La epilepsia idiopática (de causa no identificable) es el tipo de epilepsia más frecuente y afecta a 6 de cada 10 personas con este trastorno. La epilepsia con causas conocidas se denomina epilepsia secundaria o sintomática y es consecuencia de un desorden conocido del sistema nervioso central (SNC). Entre las causas que originan la epilepsia sintomática se incluyen; neoplasias benignas y malignas (p. ej. meningioma, gliomas, metástasis), canalopatías y alteraciones genéticas (p. ej. Síndrome de Dravet, epilepsia mioclónica juvenil, errores innatos del metabolismo, epilepsias focales de origen genético, trastornos cromosómicos), trastornos de la migración neuronal (p. ej. displasias corticales), enfermedades neurodegenerativas (p. ej. enfermedad de Alzheimer), lesiones vasculares (p. ej. angiomas cavernosos, malformaciones arteriovenosas, evento vascular cerebral, *Status Epilepticus* (SE)), encefalopatía anoxo-isquémica (p. ej. hipoxemia neonatal, paro cardiorrespiratorio), neuroinfecciones (p. ej. neurocisticercosis, encefalitis viral), trastornos metabólicos y trastornos autoinmunes (p. ej. encefalitis límbica, síndrome de Kozhevnikov-Rasmussen) (Engel, 2001).

1.1.4 Epidemiología

La epilepsia es considerada como una de las enfermedades con mayor prevalencia en todo el mundo (1-2% de la población), con una incidencia acumulada de por vida que se acerca al 3% (Laroche y Helmers, 2004; McNamara, 1999). En la actualidad existen de 40 a 50 millones de pacientes epilépticos en el mundo. Según estimaciones de la Organización Mundial de la

Salud (OMS) anualmente se diagnostican alrededor de 2.4 millones de casos de epilepsia y cerca del 80% de los pacientes viven en países con bajos ingresos (OMS, 2016). En México la prevalencia en los centros del Programa Prioritario de Epilepsia (PPE) es de 11 a 15 pacientes por cada 1000 habitantes (PPE, 2014). Por tanto, se estima que en México hay alrededor dos millones de personas con epilepsia (Secretaría de Salud, 2016). Datos del Instituto Mexicano del Seguro Social mencionan que en el 2012 la epilepsia ocupaba el lugar número 17 de la consulta de medicina familiar y el lugar número 13 de la consulta de neurología (PPE, 2014).

1.1.5 Repercusiones sociales y económicas

La epilepsia tiene importantes repercusiones económicas debido a la atención sanitaria que requiere, muertes prematuras y la pérdida de productividad laboral que ocasiona. En 2012 la epilepsia provocó la pérdida de alrededor de 20.6 millones de años de vida ajustados en función de la discapacidad que genera. En Estados Unidos el costo anual promedio que resulta del cuidado de la salud por paciente con epilepsia oscila entre 1,022 y 19,749 dólares (Begley y Durgin, 2015). Un estudio realizado en la India (1998) reveló que el costo del tratamiento antiepiléptico por paciente representaba el 88.2% del producto nacional bruto per cápita y los gastos relacionados con la epilepsia incluidos los gastos médicos, de transporte y la pérdida del tiempo de trabajo superaban los 2600 millones de dólares al año (Megiddo et al., 2016).

1.1.6 Comorbilidades de la epilepsia

Los pacientes con epilepsia presentan una serie de comorbilidades que incluyen disfunciones cardiovasculares, respiratorias y psiquiátricas. En especial los pacientes con epilepsia tienen una mayor probabilidad (20-40%)

de presentar trastornos psiquiátricos en comparación con la población general (Devinsky, 2003). Los trastornos psiquiátricos más frecuentes son la ansiedad, depresión, psicosis, alteraciones cognitivas y desórdenes de personalidad (LaFrance et al., 2008). En pacientes con epilepsia la ansiedad y depresión son las enfermedades que muestran una mayor prevalencia (15-25% y 11-80%, respectivamente), comparado con la población en general (5.1-7.2% y 5-17%, respectivamente). El riesgo de psicosis en los pacientes con epilepsia es significativamente mayor (6-12 veces) que en la población general y la prevalencia se ha estimado en un 10% (LaFrance et al., 2008; Torta y Keller, 1999). Específicamente, los pacientes con epilepsia tienen una probabilidad dos veces mayor a presentar esquizofrenia. Por otra parte, la probabilidad de padecer trastorno de déficit de atención e hiperactividad es 4 veces mayor en relación a la población en general. Los desórdenes de personalidad se presentan en 5-18% de las personas con epilepsia (Matsuura et al., 2003).

Además de las comorbilidades psiquiátricas, los pacientes con epilepsia pueden presentar otro tipo de comorbilidades entre los que se encuentran anemia, trastornos cardiovasculares, accidentes cerebro-vasculares, migraña, tumores y apnea de sueño (Chihorek et al., 2007; Forsgren y Nyström, 1990; Li et al., 1997; Malow et al., 2008; Rogawski, 2012).

Aunque los efectos sociales pueden variar según el país, la discriminación y la estigmatización social que rodean a los pacientes con epilepsia en todo el mundo, son a menudo más difíciles de vencer que las propias crisis epilépticas. Las personas que viven con epilepsia pueden ser objeto de prejuicios y la estigmatización de la enfermedad puede hacer que los pacientes no busquen tratamiento (OMS, 2016).

1.1.7 Epilepsia de lóbulo temporal

La epilepsia de lóbulo temporal (ELT) es el tipo de epilepsia focal más común en adultos y cerca del 30% de los pacientes son refractarios al tratamiento farmacológico (Engel, 1996). Más del 70% de los pacientes con ELT presentan esclerosis temporal mesial, la cual está caracterizada por atrofia hipocampal, acompañada de pérdida neuronal y proliferación de células gliales (Malmgren y Thom, 2012). Además, los pacientes con ELT sufren frecuentemente de comorbilidades que van desde alteraciones en procesos de memoria hasta alteraciones severas en procesos cognitivos (Hermann et al., 2007).

1.1.7.1 Causas de la ELT

Entre los factores que pueden predisponer al desarrollo de ELT se encuentran los siguientes: crisis febriles durante la niñez, alteraciones cerebrales durante nacimiento, traumatismo cráneo encefálico y *SE*. Cada una de estas lesiones cerebrales puede desencadenar una serie de procesos neurodegenerativos y la reorganización anormal de los circuitos neuronales conduciendo al desarrollo de epilepsia (Engel, 1996; Mathern et al., 1997).

1.2 *Status Epilepticus*

1.2.1 Definición

El *SE* es una condición epiléptica aguda que se caracteriza por crisis repetidas (parciales o generalizadas, convulsivas o no convulsivas) durante un periodo de más de 30 minutos y sin recuperación entre ellas; sin embargo, también se puede considerar como una crisis prolongada con una duración mayor a cinco minutos (Wasterlain y Chen, 2008). Recientemente la ILAE propuso una nueva definición basada en el conocimiento de la fisiopatología y

la necesidad de tratamiento clínico. Definiendo al *SE* como el resultado de la falla en los mecanismos responsables de la terminación de las crisis o por el inicio de los mecanismos que conducen al desarrollo de actividad epileptiforme por más de 30 minutos (Trinka et al., 2015).

El *SE* es una de las emergencias neurológicas más comunes con una incidencia anual de 10 a 41 casos por cada 100,000 habitantes (Coeytaux et al., 2000; DeLorenzo et al., 1996; Hesdorffer et al., 1998a; Knake et al., 2001; Vignatelli et al., 2003). Además, el *SE* se asocia con la mayor morbilidad y mortalidad que cualquier otra alteración neurológica (22,000 a 42,000 muertes por año) y factores como la edad (>60 años), etiología y duración del *SE* son determinantes en la severidad de este padecimiento (DeLorenzo et al., 1996; Towne et al., 1994).

1.2.2 Clasificación del *SE*

Con base en la presencia o ausencia de síntomas motores, el *SE* se puede clasificar en: *SE* con síntomas motores prominentes (*SE* convulsivo) y el *SE* sin manifestaciones motoras (*SE* no convulsivo). El término “convulsivo” se refiere a la presencia de episodios de contracciones musculares anormales, excesivas y habitualmente bilaterales que pueden ser sostenidas o interrumpidas (Blume et al., 2001; Trinka et al., 2015). El *SE* convulsivo comprende 37-70% de todas las formas de *status* y su incidencia anual es de hasta 40 casos por cada 100,000 habitantes (Trinka et al., 2012; Waterhouse, 2008).

1.2.3 Consecuencias del *SE*

El desarrollo de *SE* refractario al tratamiento farmacológico incrementa significativamente el riesgo de la aparición de crisis epilépticas no provocadas

(epilepsia, 41%) (Hesdorffer et al., 1998a, 1998b; Holtkamp et al., 2005). En algunos casos el desarrollo de crisis recurrentes espontáneas (CRE), puede ser consecuencia de un episodio prolongado de *SE* que induce el desarrollo de epileptogénesis (Trinka et al., 2012).

1.2.3.1 Epileptogénesis

La epileptogénesis se refiere al fenómeno en la que diversos tipos de alteraciones cerebrales (p. ej. lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular, crisis febriles y *SE*) desencadenan una cascada de alteraciones que culminan con la aparición de CRE (Pitkänen y Lukasiuk, 2009). En el proceso de epileptogénesis se pueden definir 3 etapas: 1) Daño inicial, 2) fase latente (período libre de crisis) y 3) aparición de CRE (epilepsia, Figura 1).

Durante la fase latente de la epileptogénesis, se han podido identificar una cascada de alteraciones entre las que se incluyen; el daño neuronal, neurogénesis, rearborización o crecimiento axonal, gliosis, inflamación, ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE), angiogénesis, incremento en la liberación de glutamato, alteraciones en la matriz extracelular, así como cierto tipo de canalopatías y actividad electrográfica de alta frecuencia, que en conjunto contribuyen de manera importante al desarrollo de epilepsia (CRE, Figura 1) (Löscher, 2015; Pitkänen y Lukasiuk, 2009).

1.2.3.1.1 Incremento en la liberación de glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC. Por estudios en modelos animales se sabe que antes del inicio del *SE*, los niveles de este neurotransmisor se incrementan considerablemente y se mantienen elevados hasta la etapa crónica del modelo (Millan et al., 1993; Smolders et al., 1997; Soukupova et al., 2015). A la fecha, no hay evidencia directa que asocie

el incremento de glutamato y el proceso de epileptogénesis; sin embargo, es posible sugerir que los altos niveles de glutamato juegan un papel importante en la cascada de alteraciones que contribuyen de manera importante al desarrollo de CRE (epilepsia) (Pitkänen y Lukasiuk, 2009).

El incremento en los niveles extracelulares de glutamato en la epilepsia podría deberse a una falla en la expresión o funcionamiento de los transportadores de este neurotransmisor, lo cual ha sido confirmado por la disminución en la expresión del transportador de glutamato (EAAT, *por sus siglas en inglés*) EAAT1, EAAT2, EAAT3 y EAAT4, en el tejido de pacientes con epilepsia (Proper et al., 2002; Rakhade y Loeb, 2008).

Por resultados obtenidos a partir de la cuantificación de receptores glutamatérgicos en el foco epiléptico de pacientes con ELT, se ha reportado un incremento en la densidad de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-hidroxil-5-metil-4isoxanol propionato (AMPA) y kainato. (Brines et al., 1997; Geddes et al., 1990; Hosford et al., 1991; Zilles et al., 1999). Además, estudios en modelos animales y en tejido de pacientes muestran un aumento significativo en la expresión de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR_{1,3,5,8}), asociado a una mayor expresión glial, en aquellas regiones donde aún no se observa una pérdida neuronal masiva, lo cual favorece la vulnerabilidad de estas zonas a ser hiperexcitables (Blümcke et al., 2000; Tang et al., 2001).

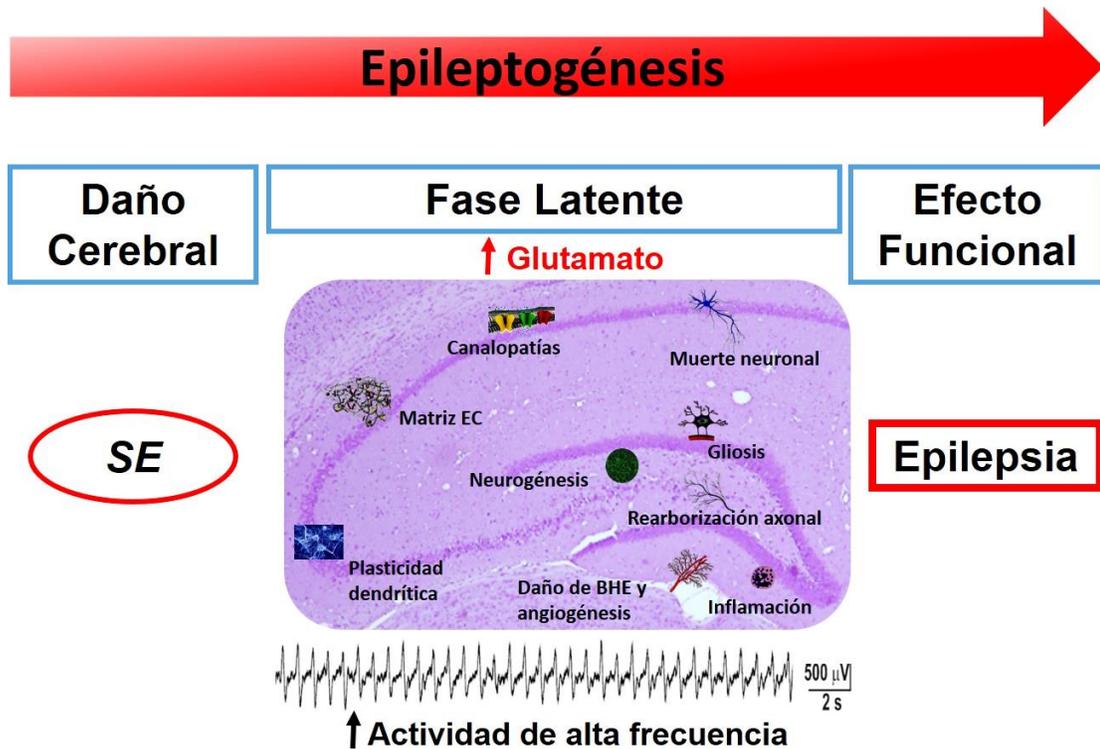


Figura 1. Alteraciones neuronales que ocurren durante el proceso de epileptogénesis. Distintos tipos de daños neuronales como el SE, lesión cerebral traumática y accidente cerebrovascular pueden desencadenar el proceso de epileptogénesis. Entre las alteraciones neuronales se incluye el incremento en la liberación de glutamato, daño neuronal, neurogénesis, gliosis, neuroinflamación, rearborización de axonal, angiogénesis y aparición de actividad eléctrica de alta frecuencia, que en conjunto inducen el desarrollo de epilepsia.

1.2.3.1.2 Daño neuronal

El hipocampo es la principal estructura involucrada en la generación de crisis parciales y SE. A partir del hipocampo la actividad epiléptica se propaga a regiones cerebrales límbicas y extra límbicas (Clifford et al., 1987; Jope et al., 1986; Turski et al., 1983). Los modelos animales de SE muestran un incremento de la actividad metabólica de estructuras como CA1, giro dentado (GD), subículo y presubículo (Bertram y Cornett, 1994). Dicho incremento conduce a la pérdida neuronal, con la consecuente disminución de la inhibición GABAérgica en hipocampo (hipótesis de “células de canasta durmientes”)

(Lothman et al., 1990). Siendo la región ventral del hipocampo, el área más susceptible al daño neuronal inducido por el *SE* (Fujikawa, 1996; Fujikawa et al., 1999). Además, el daño neuronal también es observado en otras estructuras como la amígdala, corteza entorrinal, corteza perirrinal y algunas áreas extratemporales como tálamo y cerebelo (Pitkänen y Lukasiuk, 2009).

Diversas evidencias han asociado la exposición a glutamato con la muerte neuronal dando lugar a la teoría de la excitotoxicidad celular, que puede explicar el daño neuronal asociado al *SE* (Choi, 1987; Olney et al., 1974). De acuerdo con esta teoría la activación postsináptica de los receptores NMDA inducida por la liberación excesiva presináptica de glutamato, incrementa los niveles de Ca^{2+} intracelular, que a su vez, dispara diversos procesos bioquímicos dando como resultado final la muerte celular (necrosis o apoptosis) (Covolan y Mello, 2006; Fujikawa, 1996). En este contexto, la neuroprotección es considerada esencial para la prevención de la epileptogénesis. Por otra parte, la disminución del daño neuronal durante el *SE* reduce las alteraciones conductuales y cognitivas inducidas por la actividad epiléptica (Cunha et al., 2009). Sin embargo, existen algunas evidencias que demuestran el desarrollo de epileptogénesis secundaria al *SE* a pesar del uso de fármacos con efectos neuroprotectores (André et al., 2001; François et al., 2011, 2006).

1.2.3.1.3 Neurogénesis

La inducción de crisis epilépticas desencadena el proceso de formación de nuevas neuronas en GD (neurogénesis) (Parent, 2007). El aumento de la neurogénesis puede ser detectado pocos días después del *SE* y se mantiene elevado durante varias semanas (Parent et al., 1997). La actividad epiléptica que se presenta durante el *SE* modifica la migración de las nuevas neuronas resultando en una localización ectópica en hilus, conectividad aberrante y en

el incremento de la excitabilidad celular (Scharfman et al., 2000). Por otra parte, la supresión del proceso de neurogénesis en animales con SE disminuye las alteraciones cognitivas sin modificar el desarrollo de epileptogénesis (Pekcec et al., 2008).

1.2.3.1.4 Gliosis

El análisis de la inmunoreactividad para la proteína fibrilar glial (GFAP, *por sus siglas en inglés*) muestra la presencia de células gliales hipertróficas (gliosis reactiva) como una característica morfológica del tejido esclerótico de pacientes y modelos animales de epilepsia (Wetherington et al., 2008). En el SNC existen tres tipos de células gliales: 1) astrocitos, 2) oligodendrocitos y 3) microglia (Allen y Barres, 2009).

Los astrocitos regulan los niveles extracelulares de potasio y la recaptura de glutamato. Además, de participar en el metabolismo y síntesis de diversas moléculas (p. ej. proteasas). También son capaces de sintetizar y liberar mediadores inflamatorios después del daño cerebral inicial (p. ej. SE), así como durante la fase crónica del modelo (CRE) (Coulter y Steinhäuser, 2015; Vezzani y Baram, 2007).

En cuanto a los oligodendrocitos, estos son responsables de formar la vaina de mielina alrededor de los axones en el SNC. La vaina de mielina es importante en la comunicación interneuronal manteniendo las redes neuronales y la conducción de los impulsos eléctricos (Allen y Barres, 2009). Existen algunas evidencias que han demostrado desmielinización de las neuronas del hipocampo durante el proceso de epileptogénesis. Razón por la cual, estas células juegan un papel importante en el desarrollo de la epilepsia (Luo et al., 2015; Ye et al., 2013; You et al., 2011).

Por su parte, las células microgliales son extremadamente sensibles a las alteraciones en la homeostasis cerebral y responden rápidamente a cualquier patología (Hailer, 2008). El incremento en la microglia y la migración hacia el lugar de la lesión puede ser observada entre 12 y 24 h después de la lesión, alcanzando su pico máximo de expresión después de 72 h y puede permanecer elevado durante varias semanas (Hailer et al., 1999; Jørgensen et al., 1993). La microglia activada libera compuestos con efectos nocivos para las neuronas como citocinas pro-inflamatorias (interleucina-1, interleucina-6, factor de necrosis tumoral α), proteasas y óxido nítrico (Allan et al., 2005; Kreutzberg, 1996; Nathan, 1992). Por otra parte, la microglia activada también puede liberar factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, *por sus siglas en inglés*), neurotrofina-3 o factor de crecimiento nervioso, que tienen un efecto neuroprotector y pueden promover la regeneración neuronal (Miwa et al., 1997).

1.2.3.1.5 Rearborización o crecimiento axonal

El crecimiento axonal de células granulares glutamatérgicas o fibras musgosas es la forma más estudiada de la plasticidad axonal en la epilepsia. Diversos daños cerebrales (p. ej. SE, lesión cerebral traumática y los accidentes cerebrovasculares) desencadenan la formación de fibras musgosas (Mathern et al., 1996; Pitkänen et al., 2007). La rearborización axonal se produce antes de la aparición de CRE y se mantiene durante toda la vida (Nissinen et al., 2001). La aparición de fibras musgosas se produce en los axones de las células piramidales de CA1 del hipocampo, así como en la corteza entorrinal del ser humano (Mikkonen et al., 1998). La hipótesis central sugiere que la pérdida de interneuronas GABAérgicas a nivel del hilus y la formación de nuevos circuitos glutamatérgicos aumentan la excitabilidad

neuronal que conduce a una mayor susceptibilidad para el desarrollo de crisis epilépticas (Ben-Ari, 2001).

1.2.3.1.6 Daño a la BHE

El daño a la BHE, la consiguiente expresión de factores angiogénicos (factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF *por sus siglas*) (Chopp et al., 2008; Rigau et al., 2007). Evidencias experimentales sugieren que la actividad epiléptica prolongada induce la apertura de la BHE y angiogénesis (Hellsten et al., 2005; Rigau et al., 2007; Van Vliet et al., 2007). La apertura de la BHE puede desencadenar actividad epileptiforme y llevar a un círculo vicioso que favorece a la excitabilidad neuronal (Seiffert et al., 2004).

En general, la secuencia y magnitud de las alteraciones secundarias al *SE* es fundamental para el desarrollo de epilepsia (Ben-Ari y Dudek, 2010). Por lo cual, el periodo de latencia que ocurre entre el daño inicial (p. ej. *SE*) y el desarrollo de CRE, ofrece una ventana terapéutica para evitar el proceso de epileptogénesis (Löscher, 2015; Löscher et al., 2013; Pitkänen y Lukasiuk, 2011).

1.2.3.1.7 Actividad eléctrica de alta frecuencia

Durante la conducta de sueño y vigilia se puede observar la aparición de potenciales de campo rítmicos espontáneos, entre los que se incluyen actividad delta (0.1-4Hz), theta (4-8 Hz), alfa (8-13 Hz), beta (13-30 Hz), gamma (30-90 Hz) y oscilaciones de alta frecuencia (90-500 Hz), que en conjunto corresponden al incremento del ritmo y la sincronía de las descargas neuronales. En comparación con actividad theta y gamma, las redes neuronales encargadas de la generación de actividad de alta frecuencia (90-250 Hz) son más pequeñas en tamaño y duración, pero el incremento en el número y sincronía de las descargas que se produce en una escala temporal

de unos pocos milisegundos pueden ser mucho mayores, debido a que la actividad de alta frecuencia puede facilitar la transmisión sináptica a través de redes locales (Buzsaki et al., 1992). En el hipocampo normal de rata la actividad de alta frecuencia se genera en el área de CA1 y se presenta durante episodios de inmovilidad y durante el periodo de sueño de ondas lentas (Buzsaki et al., 1992). Además, las oscilaciones de alta frecuencia pueden ser encontradas en CA3, subículo y la corteza entorrinal (Chrobak y Buzsaki, 1996; Csicsvari et al., 1999). Fisiológicamente las oscilaciones de alta frecuencia son desencadenadas por ráfagas de subpoblaciones celulares del área de CA3 resultado de una reducción transitoria en la inhibición y son capaces de reflejar grandes potenciales postsinápticos en el área de CA1 y células sub-piramidales (Buzsaki, 1986). Las oscilaciones de alta frecuencia participan en la transferencia de la información y la consolidación de la memoria. La alteración de las redes neuronales asociada a la epilepsia, puede generar actividad de alta frecuencia anormal o patológica en áreas cerebrales capaces de generar crisis como GD, subículo y corteza entorrinal (Bragin et al., 1999). Debido a que las oscilaciones de alta frecuencia no se presentan en el GD de animales normales, esta es una de las principales características de la actividad patológica y su presencia puede ser utilizada como un biomarcador de epileptogénesis (Bragin et al., 2004; Lévesque et al., 2011; Staba y Bragin, 2011).

1.2.4 Modelos animales de SE

Los modelos animales de *SE* permiten la comprensión de los mecanismos involucrados en la generación del *status* y la subyacente epileptogénesis. Lo anterior ayuda a evaluar la eficacia de FAE y otras alternativas terapéuticas para el tratamiento de la epilepsia y las consecuencias cognitivas asociadas a este padecimiento.

El hipocampo es la principal estructura involucrada en la generación de crisis parciales y *SE*. A partir del hipocampo la actividad epiléptica se propaga a regiones cerebrales límbicas y extralímbicas (Clifford et al., 1987; Jope et al., 1986; Turski et al., 1983). Los modelos animales de *SE* muestran un incremento de la actividad metabólica de estructuras como CA1, GD, subículo y presubículo (Bertram y Cornett, 1994). Después del *SE* ocurre un período de latencia (días-semanas) en el que no se presentan crisis y la actividad electroencefalográfica aparentemente es normal. Posterior al periodo de latencia, en todos los modelos animales de *SE* se observa el desarrollo gradual y progresivo de CRE (epileptogénesis). Por ello los modelos animales de *SE* son considerados modelos de epilepsia de lóbulo temporal (ELT).

1.2.4.1 Modelo de Pilocarpina y Litio-Pilocarpina

La pilocarpina es un agonista de los receptores muscarínicos (M1) altamente expresados en el hipocampo (principalmente en las células granulares de GD), estriado y corteza cerebral (Adem et al., 1997; Kuhar y Yamamura, 1976). La administración sistémica de pilocarpina (300 a 400 mg/kg, i.p.) induce el desarrollo de *SE* en ratas y ratones (Turski et al., 1983). Sin embargo, esta dosis tiene importantes efectos periféricos, por ello, es necesaria la administración concomitante de antagonistas muscarínicos, como metiloscopolamina en dosis de 1 mg/kg, i.m. Por otra parte, la administración de cloruro de litio (3 meq/kg) 24 h antes de la inyección de pilocarpina (30 a 60 mg/kg), disminuye la dosis de ésta y los efectos periféricos (Jope et al., 1986).

El modelo de pilocarpina o litio pilocarpina se caracteriza por inducir tres fases características (aguda, latente y crónica) (Jope et al., 1986; Turski et al., 1983). La fase aguda en la mayoría de los animales, comienza 5-10 min después de la administración de pilocarpina. Se caracteriza por una actividad

electroencefalográfica de bajo voltaje en corteza cerebral y amígdala, que se correlaciona con la conducta de crisis que implica acinesia, piloerección, erguimiento de orejas, temblor, salivación y diuresis. Entre 15 y 20 min después de la administración de pilocarpina se presenta actividad electroencefalográfica de alto voltaje, que inicialmente se registra en hipocampo y posteriormente se extiende a corteza y amígdala; reflejándose en conducta de masticación, mioclonías de cabeza, guiño, salivación, sacudidas de perro mojado, clonus de miembros anteriores, posición de canguro y pérdida de la postura corporal. El SE se establece aproximadamente 20 min después de la administración de pilocarpina, teniendo una duración hasta de 3 h y se caracteriza por la presencia de crisis límbicas repetidas, con prominente actividad de alto voltaje en hipocampo, corteza y amígdala. En la fase latente del modelo de pilocarpina se observan registros electroencefalográficos aparentemente normales, que se correlacionan con una conducta habitual; esta fase también es llamada silenciosa y tiene una duración de 4-44 días. La fase crónica del modelo de pilocarpina, se caracteriza por la presencia de crisis límbicas espontáneas y recurrentes (2-3 por semana) con actividad rápida de alto voltaje, registrada en hipocampo, corteza y amígdala (Jope et al., 1986; Scorza et al., 2009; Turski et al., 1983).

1.2.4.2 Modelo del Ácido Kaínico

El ácido kaínico (AK) es un agonista de los receptores ionotrópicos glutamatérgicos expresados con mayor densidad en hipocampo, especialmente en CA3, amígdala, corteza perirrinal y entorrinal (Miller et al., 1990). El AK induce actividad epiléptica repetida con subsecuente daño neuronal en hipocampo y amígdala, que se asemeja a los efectos producidos por la ELT en humanos (Ben-Ari et al., 1981; Nadler et al., 1978).

El AK puede ser administrado por vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intracerebroventricular, o mediante inyecciones intrahipocampales. En ratas adultas la dosis necesaria de AK para producir actividad epileptiforme y *SE* oscila entre 10 y 14 mg/kg, i.p. La actividad convulsiva ocurre en los primeros 60 min después de la administración de AK (Dudek et al., 2006).

Este modelo es principalmente usado en ratas neonatas de entre 5 y 20 días tras la aplicación sistémica (2-10 mg/kg, i.p) del alcaloide (Dudek et al., 2006). El AK se emplea para inducir actividad epiléptica originada en el sistema límbico e incluso puede causar *SE* (etapa aguda), el cual produce cambios neurales que promueven el proceso de epileptogénesis (etapa de latencia) dando lugar al desarrollo de CRE (etapa crónica) (Ben-Ari et al., 1981; Dudek et al., 2006; Lothman y Collins, 1981). Por lo tanto, este modelo puede emplearse para inducir *SE* o para estudiar sus consecuencias, incluyendo procesos de daño neuronal y epileptogénesis.

1.2.4.3 Modelo de Estimulación Eléctrica

La estimulación eléctrica en distintas áreas del cerebro genera descargas electroencefalográficas que se correlacionan con cambios conductuales. El modelo de *SE* inducido por estimulación eléctrica deriva de una observación casual, en donde ratas que estaban paralizadas, con oxígeno y que mantenían buen equilibrio metabólico; recibieron una estimulación eléctrica cada minuto durante más de 25 min, mostrando actividad epileptiforme en el registro electroencefalográfico después de que la estimulación eléctrica había sido detenida. La severidad y duración de las crisis auto sostenidas se correlacionaba con la duración de la estimulación eléctrica (Wasterlain, 1974, 1972). Estudios posteriores mostraron que la estimulación eléctrica continua de alta o baja frecuencia en estructuras

límbicas puede inducir *SE* (Cain et al., 1992; Milgram et al., 1985). Las estructuras límbicas susceptibles al desarrollo de *SE* por estimulación eléctrica son la vía perforante, hipocampo y amígdala (Gorter et al., 2003; Lothman et al., 1989; Mazarati et al., 1998; Nissinen et al., 2000; Sloviter, 1987; Vicedomini y Nadler, 1987).

El modelo de *SE* por estimulación eléctrica consiste en realizar la implantación de dos electrodos (uno de estimulación y otro de registro), en alguna de las regiones antes mencionadas (vía perforante, hipocampo o amígdala), aplicando pulsos monofásicos cuadrados de 1 ms de duración a una frecuencia de 20 Hz durante 30 minutos.

1.2.5 Tratamiento farmacológico del *SE*

El principal objetivo del tratamiento durante el *SE* es el rápido control de las crisis con el fin de evitar las alteraciones cognitivas a largo plazo (Abend y Dlugos, 2008). La primera línea de tratamiento para el *SE* incluye la administración intravenosa de benzodiazepinas tales como diazepam (DZP) o lorazepam, incrementando la inhibición GABAérgica (Prasad et al., 2014; Treiman, 2007). Sin embargo, del 35 al 50% de pacientes con *SE* presentan farmacorresistencia a tratamientos de primera elección (benzodiazepinas), 20% responde a fármacos de segunda elección (fenobarbital, fenitoína y ácido valpróico) y solamente 31% de los pacientes responde a la combinación de ambos grupos de fármacos (Alldredge et al., 2001; Holtkamp, 2011; Rossetti y Lowenstein, 2011; Treiman, 2007).

La duración del *SE* es una de las principales variantes que influye en la respuesta farmacológica a benzodiazepinas (Neligan y Shorvon, 2011). Esto es, debido a que durante el *SE* los pacientes se vuelven progresivamente resistentes a dichos agentes. Sin embargo, los pacientes responden a

antagonistas de los receptores NMDA llegado a ser particularmente eficaces para el tratamiento del *SE* de larga duración (Mazarati et al., 1998; Mazarati y Wasterlain, 1999). La pérdida de respuesta al tratamiento farmacológico durante el *SE* se debe a la internalización de receptores GABAérgicos y externalización de receptores tipo NMDA (Naylor et al., 2013, 2005). Considerando lo anterior, el uso de benzodiacepinas para el tratamiento del *SE* es relativamente limitado. Aunado a la refractariedad farmacológica del *SE*, los tratamientos utilizados actualmente causan severos efectos secundarios entre los que se encuentran: sedación, erupciones cutáneas, fallas multiorgánicas, alteraciones de la función motora, trastornos psiquiátricos y exacerbación de la actividad epileptiforme (Abend y Dlugos, 2008; Holtkamp, 2011; Manno, 2003). Por otra parte, no existe ningún fármaco que detenga el daño neuronal inducido por el *SE* (Löscher, 2015).

Lo anterior hace necesario la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el control del *SE* con menos efectos secundarios y capaces de disminuir el daño neuronal asociado al *status*. Actualmente se ha sugerido el uso de la combinación de fármacos con múltiples mecanismos de acción (farmacología en red) para el control del *SE* y sus consecuencias del mismo (Löscher, 2015). Para lo cual, se ha sugerido el uso del levetiracetam (LEV, un fármaco de nueva generación y con amplio espectro de eficacia clínica) como un candidato ideal para su combinación con otros fármacos antiepilépticos (FAE) (Kaminski et al., 2009).

1.2.5.1 Levetiracetam

El LEV ((S)- α -etil-2-oxo-1-pirrolidina acetamida) es un FAE de amplio espectro utilizado como mono y poli-terapia para el tratamiento de crisis parciales refractarias al tratamiento farmacológico con o sin generalización secundaria (Aiguabella et al., 2011; Lyseng-Williamson, 2011) (Figura 2). El

LEV también es utilizado para el tratamiento de crisis mioclónicas juveniles y crisis idiopáticas tónico clónicas generalizadas (Lyseng-Williamson, 2011).

El LEV tiene efectos anticonvulsivantes en ratones con crisis audiogénicas; además, retrasa el desarrollo de epileptogénesis en el modelo de kindling amigdalino (Gower et al., 1992; Löscher et al., 1998). Sin embargo, no evita las crisis generalizadas inducidas por la estimulación eléctrica máxima y por la administración de pentilenetetrazol (Gower et al., 1992; Klitgaard et al., 1998; Löscher y Hönack, 1993).

El pretratamiento con LEV previene el desarrollo de *SE* y reduce el daño neuronal evaluado a corto plazo (Itoh et al., 2015; Lee et al., 2013; Mazarati et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Zheng et al., 2010). Sin embargo, la administración repetida de LEV (231-315 mg/kg, por día durante 4 semanas) después del *SE* no evita la aparición de CRE. Además, desarrolla tolerancia al tratamiento, se observa un incremento en la frecuencia y duración de las crisis (Brandt et al., 2007; Glien et al., 2002). La pérdida de actividad anticonvulsivante se asocia al incremento en el daño neuronal durante la fase crónica del modelo, condición asociada a niveles elevados de glutamato en el periodo interictal (Brandt et al., 2007; Soukupova et al., 2015).

Actualmente el LEV ha sido utilizado para el tratamiento del *SE* refractario a fármacos, obteniéndose resultados satisfactorios y con un alto índice de seguridad en pacientes pediátricos (Abend et al., 2009; Abend y Dlugos, 2008; İşgüder et al., 2016).

1.2.5.1.1 Mecanismo de acción

A la fecha el mecanismo de acción del LEV no está completamente elucidado. Sin embargo, existe una fuerte correlación funcional entre la afinidad del LEV con la proteína vesicular sináptica 2A (SV2A) y su potencia

como anticonvulsivante (Lynch et al., 2004). Por otra parte, el LEV produce una reducción de las corrientes de Ca^{2+} activadas por alto voltaje en neuronas piramidales de hipocampo y reduce las corrientes rectificadoras entrantes mediadas por K^+ (Madeja et al., 2003; Niespodziany et al., 2001). Este efecto se encuentra asociado a la disminución en la liberación intracelular de Ca^{2+} (Nagarkatti et al., 2008). Por estudios en rebanadas de hipocampo de rata se pudo observar que el LEV no modula los parámetros de excitabilidad neuronal mediados por el canal de Na^+ dependiente de voltaje (Zona et al., 2001). En cuanto a su efecto sobre la actividad inhibitoria, el LEV suprime los efectos de moduladores alostéricos negativos (β -carbonilos y zinc) sobre las corrientes de los receptores GABA_A y glicina (Rigo et al., 2002).

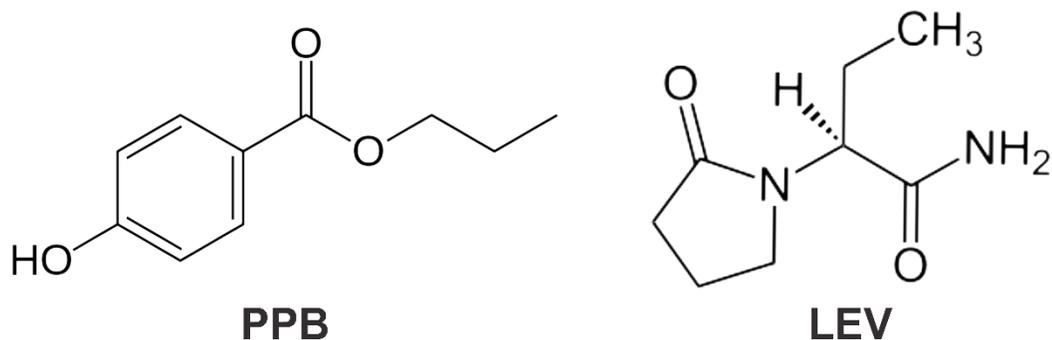


Figura 2. Estructura molecular del propilparabeno (PPB) y levetiracetam (LEV).

1.2.6 Búsqueda de nuevos FAE

Como se mencionó anteriormente, un alto porcentaje de pacientes con *SE* son refractarios al tratamiento farmacológico. Además, los FAE utilizados actualmente causan severos efectos secundarios (Abend y Dlugos, 2008; Holtkamp, 2011; Manno, 2003). Por otra parte, al presente no existe ningún FAE capaz de evitar el proceso de epileptogénesis inducido por el *SE*. Lo anterior hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el control del *SE* con efectos adversos mínimos y que eviten el desarrollo de CRE.

En las últimas décadas, la industria farmacéutica internacional ha reconocido la potencialidad (en términos terapéuticos y económicos) del proceso conocido como "reutilización de fármacos" o "reprogramación de fármacos", esto es, identificar nuevas indicaciones terapéuticas para un fármaco conocido (Sleigh y Barton, 2010; Verma et al., 2005). Entre los numerosos ejemplos que pueden ser mencionados, se encuentra el uso de la aspirina (tradicionalmente utilizado como analgésico, antipirético y antiinflamatorio) como cardioprotector; el uso del sildenafil (originalmente desarrollado para el tratamiento de la angina de pecho) en el tratamiento de la disfunción eréctil y la talidomida (utilizada para el tratamiento de insomnio y náuseas en embarazadas) para el tratamiento del eritema nodoso en pacientes con lepra (García-Domenech et al., 2008).

Tradicionalmente la detección de segundos usos terapéuticos se producía por azar. Sin embargo, actualmente se han desarrollado algunas metodologías computacionales de búsqueda racional de fármacos que permiten abordar la reutilización de fármacos desde una perspectiva racional y sistemática. Una de las metodologías utilizadas es el "*Screening*" virtual (SV), un conjunto de técnicas computacionales que permite identificar compuestos potencialmente interesantes desde el punto de vista farmacológico a partir de representaciones de la estructura molecular de los compuestos químicos (Rollinger et al., 2008).

1.2.6.1 Ventajas del "*Screening*" virtual

El principal objetivo del SV es identificar moléculas capaces de interactuar con un objetivo macromolecular de interés. Siendo una herramienta ideal para investigar de manera económica y eficiente posibles segundos usos terapéuticos de fármacos ya conocidos (Rollinger et al., 2008).

En nuestra región la aplicación del SV es particularmente interesante, debido a que permitiría obtener patentes de segundos usos e introducir en el mercado medicamentos innovadores con una inversión radicalmente menor a la que se necesita para desarrollar un nuevo fármaco. La reducción en los costos se debe a que, cuando se descubre una nueva indicación para un fármaco que ya ha demostrado seguridad para su uso en humanos y que posee un perfil farmacocinético conocido, es posible evitar la realización de buena parte de las investigaciones clínicas.

Entre las ventajas del SV se encuentran su rapidez de análisis, bajo costo, carácter teórico, posibilidad de encontrar nuevas indicaciones terapéuticas para fármacos ya conocidos y aplicados en clínica. Además, responden a la filosofía de las pautas de bioética vigentes a nivel internacional que proponen utilizar modelos computacionales y ensayos *in vitro* previos a la realización de ensayos preclínicos y clínicos *in vivo* (Talevi y Bruno-Blanch, 2009). Mediante el uso de la técnica de SV basada en descriptores topológicos, Talevi et al. (2007) describieron al propilparabeno (PPB), como una molécula con potencial efecto anticonvulsivante.

1.2.5.1.1 Propilparabeno

El PPB es un éster del ácido *para*-hidroxibenzoico utilizado como agente antimicrobial contra mohos y levaduras (Soni et al., 2001) (Figura 2). El PPB reúne los criterios del conservador ideal con amplio espectro de actividad antimicrobial, de uso seguro y estable en un amplio rango de pH. El PPB es comúnmente usado como conservador en la industria cosmética, farmacéutica y de alimentos desde hace aproximadamente 65 años (Soni et al., 2001).

1.2.6.1.1.1 Mecanismo de acción

El PPB ejerce su actividad antimicrobiana a través de la interacción con canales mecanosensibles alterando los gradientes osmóticos en las bacterias (Nguyen et al., 2005). Además, de inhibir la síntesis de ADN y ARN, así como de algunas enzimas clave tales como: ATPasas y fosfotransferasas en especies bacterianas o por interrupción de los procesos de transporte de membrana (Freese et al., 1973; Ma y Marquis, 1996). Por otra parte, el PPB bloquea canales de Na⁺ dependientes de voltaje en células piramidales de CA1, así como en cultivos de cardiomiocitos de rata (Ji et al., 2004; Lara-Valderrábano et al., 2016).

1.2.6.1.1.2 PPB y modelos de crisis convulsivas

La administración de PPB evita el desarrollo de crisis tónicas características del modelo de estimulación eléctrica máxima (Talevi et al., 2007). Datos previos del laboratorio demostraron que la administración intraperitoneal de PPB (60 mg/kg) en conjunto con dosis subefectivas de FAE (DZP y fenobarbital) incrementa de manera significativa la latencia para el desarrollo de crisis convulsivas en el modelo de pentilentetrazol en roedores (Enrique et al., *en proceso de publicación*).

En un experimento previo de nuestro laboratorio, se evaluó el efecto de la administración de PPB (178 mg / kg, i.p.) 3 h después del inicio de la actividad convulsiva inducida por el SE. Observando que el PPB disminuye considerablemente el daño neuronal en GD, hilus y CA3; sin presentar cambios aparentes en las células piramidales de CA1 (Santana-Gómez, 2012).

1.2.6.1.1.3 Efectos adversos del PPB

Una cuestión importante a considerar es que el PPB induce una serie de efectos adversos entre los que se incluyen la disminución en la liberación

de testosterona, débil actividad estrogénica, aumento en la expresión del gen para el receptor a progesterona. Además, de producir cambios en la morfología del útero (Blair et al., 2000; Chen et al., 2007; Lemini et al., 2004; Okubo et al., 2001). Adicionalmente, se ha descrito que los parabenos pueden ser encontrados en de tumores de mama (Darbre y Harvey, 2014). Por lo cual esta serie de evidencias representan un motivo de preocupación en relación con el impacto del PPB en la salud de los pacientes.

2. Justificación

A pesar del desarrollo de nuevos FAE, estos no han podido evitar la presencia de las alteraciones neuronales y epileptogénesis secundarias a un daño inicial (p. ej. *SE*). Por otra parte, la administración de dosis únicas de PPB al término del *SE* disminuye el daño neuronal evaluado 7 días después del mismo. Sin embargo, al día de hoy no hay evidencias disponibles que demuestren si este efecto es permanente. Dado que el PPB es capaz de bloquear canales de Na⁺ dependientes de voltaje, es posible sugerir que la administración sola o en combinación con un FAE con distinto mecanismo de acción como el LEV (FAE de nueva generación y con amplio espectro de eficacia clínica) evite la epileptogénesis inducida por el *SE*. Efectos asociados a una disminución de la liberación de glutamato, hiperexcitabilidad y gliosis hipocampal.

3. Hipótesis

El PPB y su combinación con LEV evitan el daño neuronal a corto y largo plazo inducido por el *SE* en rata. Este efecto se asocia a una reducción en la liberación de glutamato, hiperexcitabilidad y gliosis hipocampal.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar a corto y largo plazo los efectos neuroprotectores del PPB solo y asociado a LEV, en ratas con *SE* y su correlación con la liberación de glutamato, hiperexcitabilidad y gliosis hipocampal.

4.2 Objetivos particulares

4.2.1 Objetivo 1

Evaluar el efecto de la administración aguda post-*SE* del PPB en la liberación de glutamato y oscilaciones hipocampales (actividad electrográfica) secundarias al *SE*, así como el daño neuronal y gliosis 24 h después del mismo.

4.2.2 Objetivo 2

Evaluar el efecto de la administración subcrónica post-*SE* del PPB y su combinación con LEV en el daño neuronal, liberación de glutamato, excitabilidad y gliosis hipocampales en animales con CRE inducidas por el *SE*.

4.2.3 Objetivo 3

Evaluar en animales sanos, los efectos tóxicos inducidos por la administración sub-crónica de PPB, solo y en combinación con LEV, en la actividad motora, daño renal y hepático.

5. Metodología general

A continuación, se describe la metodología general utilizada para la realización de los experimentos 1 y 2.

5.1 Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa *Wistar* con un peso de entre 250-300 g. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico transparentes bajo condiciones ambientales controladas (ciclos de luz/oscuridad 12 h, 22-25 °C) con acceso a alimento y agua *ad libitum*. El protocolo experimental se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y los Comités de Ética del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (protocolo # 0125-15).

5.2 Cirugía

Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (80 mg/kg, i.p.) y xilazina (20 mg/kg, i.m.). Posteriormente, se montaron sobre el marco estereotáctico y un electrodo bipolar acoplado a una cánula guía formado por dos hebras torcidas de alambre de acero inoxidable aislado excepto en las puntas, se implantó a nivel de hipocampo ventral derecho acoplado a una cánula guía de acuerdo a las siguientes coordenadas con referencia a bregma y a la superficie craneal: anteroposterior -5.3 mm; lateral -5.2 mm; profundidad -7.3 mm y -4.3 mm para los electrodos y las cánulas; respectivamente (Paxinos y Watson, 2007). Para dar soporte al implante se colocaron tornillos de acero inoxidable en el cráneo sobre la corteza frontal y cerebelar. Los electrodos se acoplaron a un conector y se fijaron al cráneo con acrílico dental. Posteriormente, las ratas se dejaron recuperar durante 7 días antes de cualquier manipulación adicional. Después del período de recuperación los

animales recibieron una administración diaria de solución salina (1 ml/kg, i.p./día) durante 5 días para habituarlos a la manipulación.

5.3 Inducción del SE

Veinticuatro horas después de la última administración de solución salina, los animales recibieron cloruro de litio (3 meq/kg, i.p.) y posteriormente (20 h), metilescopolamina (1 mg/kg, i.m.). A continuación (30 min), se administró hidroclicloruro de pilocarpina (30 mg/kg, i.p.) y se evaluó la latencia para el establecimiento del SE (Honchar et al., 1983; Turski et al., 1983). El inicio del SE se determinó cuando los animales presentaron crisis convulsivas de forma continua durante más de 2 min sin recuperación entre ellas. Para controlar las crisis convulsivas, los animales recibieron DZP 2 y 8 h después del inicio del SE (2.5 y 1.25 mg/kg, i.m.; respectivamente) (Dubé et al., 2001; François et al., 2006).

5.4 Experimento de microdiálisis

Para el experimento de microdiálisis se utilizó una cánula construida de acuerdo con Maidment et al. (1989) y diseñada para sobresalir 3 mm más allá de la punta del borde inferior de la cánula guía en hipocampo ventral. La parte activa de la cánula de microdiálisis consistió en una membrana de poliacrilonitrilo (poro de 40,000 Da). La cánula de microdiálisis se perfundió continuamente a un flujo de 2 µl/min con líquido cefalorraquídeo artificial fresco previamente filtrado y esterilizado (concentraciones en mM: cloruro de sodio 125, cloruro de potasio 2.5, fosfato dibásico de sodio 0.5, fosfato monobásico de sodio 5, cloruro de magnesio 1, ácido ascórbico 0.2, cloruro de calcio 1.2; pH 7.4). Después de un período de estabilización (2 h), los dializados se recuperaron cada 30 min durante el experimento. Posterior a la recuperación, las muestras se diluyeron con ácido perclórico (HClO₄, 2 N, 1:20) y se utilizaron

para determinar la liberación de glutamato mediante el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *por sus siglas en inglés*).

5.5 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Para la separación y cuantificación de glutamato se utilizaron 16 μ l de la mezcla (dializado-HClO₄) que se combinaron con 6 μ l de *orto*-ftaldialdehído (OPA). La mezcla se agitó durante 30 s y 2 min más tarde se inyectó en el cromatógrafo. El sistema de HPLC consistió de un detector de fluorescencia utilizando una λ de excitación de 360 nm y una λ de emisión de 450 nm. Para la separación y cuantificación de glutamato se utilizó una columna de cromatografía de fase reversa de 3.9 x 150 mm (Nova-Pack, 4 μ m, C₁₈, Waters®), como fase móvil se usó una solución A (3.26 gr de acetato de sodio disuelto en metanol al 10%; pH 5.75) y solución B (20% de solución A y 80% de metanol; pH 6.75) a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min con un sistema de detección fluorescente (Waters® modelo 474) (Kendrick et al., 1988). Los niveles de glutamato se expresaron en valores de concentración (μ M) y como porcentaje de cambio con respecto a las condiciones basales. Dependiendo del experimento los resultados obtenidos a partir de la liberación de glutamato se analizaron mediante la prueba t-Student o ANOVA de una vía seguida por una prueba post-hoc LSD de Fisher.

5.6 Evaluación de la actividad electrográfica hipocampal

La actividad electrográfica del hipocampo se registró con un amplificador modelo P511 (Grass, Massachusetts) y las señales se analizaron con un filtro pasa banda entre 0.1-250 Hz. Se realizó el análisis espectral usando el método de la Transformada Rápida de Fourier (TRF) durante períodos de 1 min para cada etapa de interés. El procesamiento de las señales obtenidas se realizó mediante el uso del programa computacional ADQ8 desarrollado en el Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente

Muñiz" (Fernández-Mas et al., 1998; Valdés-Cruz et al., 2012). Para el análisis de TRF se utilizaron registros libres de artefactos que se segmentaron en periodos de 60 s para cada animal y condición experimental. Con el propósito de eliminar la variabilidad inter-individual los espectros de potencia se normalizaron por separado para cada sujeto y condición experimental (0.1-4, 4-8, 8-13, 13-30, 30-90 y 90-250 Hz). Los datos obtenidos se presentaron como valores de potencia relativa y dependiendo del experimento se evaluaron mediante la prueba t-Student o ANOVA de una vía seguida por una prueba post-hoc LSD de Fisher de múltiples comparaciones.

5.7 Evaluación de la excitabilidad hipocampal

La estimación del umbral post-descarga (UPD) es una herramienta que permite evaluar la excitabilidad neuronal de un área específica del cerebro. El UPD se define como la intensidad mínima de corriente necesaria para producir un cambio conductual y/o post-descarga electrográfica mayor a 3 s. Esta determinación consistió en la aplicación de un estímulo eléctrico en el hipocampo ventral a través de un procedimiento en escalera, esto es, aplicando una serie de estímulos (pulsos cuadrados de 1 ms, 60 Hz por 1 s) en intervalos de 1 min comenzando con una corriente de 10 μ A e incrementándola en escalones de 20% cada min con respecto a la corriente previa hasta alcanzar el umbral, indicado generalmente a partir de un cambio conductual (como guiño o movimientos de cabeza) o postdescarga con una duración mayor a 3 s (Racine, 1972a). Los estímulos eléctricos se generaron con un estimulador modelo GRASS S-48. Dependiendo del experimento los valores de UPD se analizaron mediante la prueba t-Student o ANOVA de una vía seguida por una prueba post-hoc LSD de Fisher y se expresaron como la media \pm EE de la corriente requerida (μ A) para alcanzar el UPD.

5.8 Análisis histológico

5.8.1 Perfusión

Para el proceso de perfusión los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (100 mg/kg, i.p.), xilacina (20 mg/kg, i.p.) y se perfundieron vía ventrículo izquierdo pasando solución salina (0.9%) con heparina (1mg/l) durante 15 min (aproximadamente 200-250 ml). Posteriormente, los animales se perfundieron con paraformaldehído al 4% + 0.2% de glutaraldehído en una solución amortiguadora de fosfatos (220 mosm).

Después de perfundir a los animales se extrajeron los distintos tejidos de interés (cerebro, tejido hepático y tejido renal), que posteriormente se colocaron en paraformaldehído al 4%, durante 168 h a una temperatura de 4 °C (Luna, 1968). Inmediatamente después, las muestras se incluyeron en parafina para su procesamiento.

Posterior a la perfusión, una porción adicional de tejido hepático se sumergió en sacarosa al 30% durante 48 h. Después, las muestras se mantuvieron en congelación a una temperatura de -75 °C para su posterior evaluación, mediante la tinción de rojo oleoso (ver sección 6.3.1.2.2).

5.8.2 Evaluación del tejido cerebral

Se obtuvieron cortes coronales seriados de 5 µm de espesor a nivel de hipocampo dorsal y ventral. Los cortes obtenidos se montaron en laminillas previamente cubiertas con adhesivo poli-L-lisina (Sigma Aldrich). Las secciones se desparafinizaron y rehidrataron mediante el uso de xileno y soluciones a concentraciones decrecientes de alcohol (100%, 96% y 70%; 5 min en cada solución). Dependiendo del análisis a realizar se utilizaron distintas laminillas para la evaluación del sitio de implante (tinción de Nissl),

preservación neuronal (inmunofluorescencia para NeuN) y daño neuronal (Fluoro-Jade B), así como la evaluación de la gliosis (inmunofluorescencia para GFAP).

5.8.2.1 Tinción de Nissl

Este colorante es una anilina básica (cargada de forma positiva) que se une a las regiones basófilas de las células, lo cual permite observar la trayectoria del electrodo bipolar y la cánula de microdiálisis, así como tener un primer acercamiento del daño neuronal en diversas áreas cerebrales (Luna, 1968).

Las laminillas desparafinadas y rehidratadas se incubaron en una solución violeta de cresilo durante 30 min. Posteriormente, las muestras se lavaron con agua destilada durante 1 min y a continuación, se sumergieron en alcohol al 70%, 96%, 100% y por último en xileno (5 min en cada solución). Las laminillas se cubrieron con resina sintética Entellan® (Merck Millipore) para ser observadas con un microscopio óptico (Luna, 1968).

5.8.2.2 Tinción de Fluoro-Jade B

El Fluoro-Jade B es un fluorocromo derivado de la fluoresceína que se utiliza para identificar neuronas en proceso de daño en el sistema nervioso (Schmued et al., 1997). Para realizar esta tinción las laminillas se sumergieron en alcohol básico (20 ml de hidróxido de sodio al 5% + 80 ml de alcohol absoluto) durante 5 min. Después, se incubaron en alcohol al 70% y agua destilada durante 2 min en cada solución. Posteriormente, las muestras se pasaron a una solución de permanganato de potasio al 0.06% durante 15 min agitándose suavemente sobre una plataforma giratoria y a continuación, se realizó un lavado con agua destilada (2 min). Finalmente, las muestras se incubaron en una solución de Fluoro-Jade B (0.0001%, en ácido acético,

Millipore) durante 24 h. Después de la tinción, las laminillas se lavaron con agua destilada y se montaron con resina sintética (Schmued et al., 1997).

5.8.2.3 Inmunofluorescencia para NeuN-GFAP-DAPI

Las muestras se incubaron en una solución buffer de citratos (pH 6.0) durante 2 min en microondas y se mantuvieron en agitación durante otros 20 min. Posteriormente, se lavaron tres veces con buffer de fosfatos (PBS, *por sus siglas en inglés*; pH 7.4, 5 min cada una) y se bloquearon con suero de cabra (5%), albúmina de suero bovino (BSA, *por sus siglas en inglés*, 3%) y Triton (0.3%) durante 2 h. Las secciones se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario: anti-NeuN (1:100, # MAB3077 Millipore) y anti-GFAP (1:500, # Z0334 DAKO) a una temperatura de 4 °C. Después de esto, las laminillas se enjuagaron tres veces con PBS y se incubaron durante 2 h con anticuerpos secundarios (Alexa Fluor 488 y 648 Molecular Probes®, Invitrogen™) a temperatura ambiente. Las secciones se contra tiñeron con dihidrocloruro de 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI, *por sus siglas en inglés*) y se montaron con Vectashield (Vector Labs.).

5.8.2.4 Cuantificación celular

Las secciones de tejido cerebral procesadas con inmunofluorescencia para NeuN-GFAP-DAPI y tinción de Fluoro-Jade B se evaluaron con un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss), el cual cuenta con una cámara refrigerada “*Evolution*” y un analizador de imágenes Image Pro Plus 5 de Media Cybernetics. La densidad celular promedio por unidad de volumen (mm^3) para las células positivas a NeuN y Fluoro-Jade B se determinó en el GD, hilus, CA1 y CA3 de las secciones dorsal y ventral del hipocampo utilizando el método de conteo fraccionario (West et al., 1991).

Para este análisis se evaluaron cortes seriados hipocampales de 5 μm de espesor evaluando un corte de cada serie (5 series en total). Por lo cual, la fracción de muestreo (ssf) correspondió a 1/5. Para la realización del cálculo se tomó la fracción de volumen de cada área del hipocampo evaluada $asf = \text{área (cuadro)} / \text{área (x,y)}$ y que correspondió al área de conteo (0.460 \cdot 0.600 mm). La altura del disector, h , se calculó en relación al espesor del corte t (t/h). El número de células se calculó usando la siguiente fórmula: $N = (\sum Q^-) \cdot (t/h) \cdot (1/asf) \cdot (1/ssf)$. En esta fórmula, Q^- representa el número de células positivas en una fracción de volumen conocida de cada área del hipocampo (West et al., 1991). La comparación estadística de la densidad de células positivas para NeuN se realizó mediante la prueba de ANOVA de una vía seguido de la prueba de múltiples comparaciones post-hoc de Fisher LSD y para el daño neuronal (tinción de Fluoro-Jade B) se empleó la prueba t de Student. Los valores se expresaron como la media \pm el EE del número de células positivas por mm^3 .

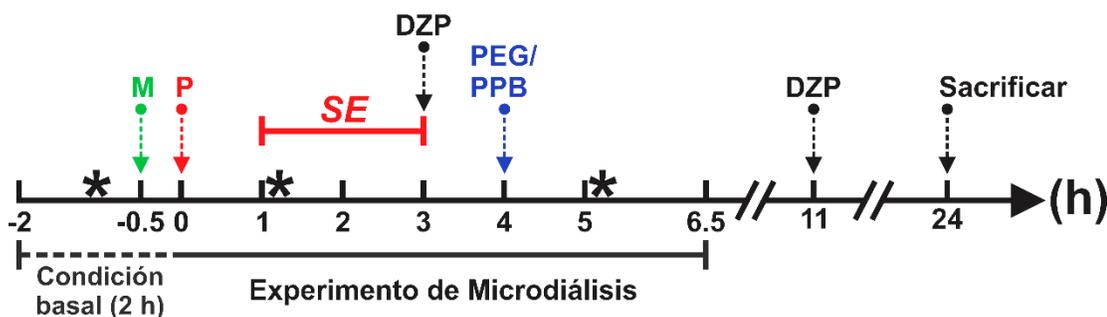
6. Experimentos

6.1 Experimento 1: Evaluación de los efectos del PPB en las consecuencias a corto plazo inducidas por el SE

Este experimento se diseñó para determinar si la administración única de PPB durante el SE modifica la actividad electrográfica, liberación de glutamato y daño neuronal subsecuente (Figura 3).

6.1.1 Metodología

Protocolo experimental



PEG 30%: 10 ml/kg, i.p.

PPB: 178 mg/kg, i.p.

Figura 3. Protocolo experimental utilizado para determinar los efectos del PPB en el período post-SE. M, metilescopolamina; P, pilocarpina; DZP, diazepam; PPB, propilparabeno; PEG, polietilenglicol. Los símbolos (*) indican los periodos de registro electrográfico para su posterior análisis.

6.1.1.1 Grupo SE-PPB178

Después del periodo de habituación, los animales previamente implantados ($n=5$, ver sección 5.2) se administraron con cloruro de litio (20 h antes de la inducción del SE). Posteriormente, se implantó la cánula de microdiálisis y se comenzó con la recolección de dializados (ver sección 5.4). Durante el periodo basal se realizó la administración de metilescopolamina y 30 min después se inyectó pilocarpina para la inducción del SE (ver sección

5.3). Dos horas después del establecimiento del *SE*, los animales recibieron DZP (2.5 mg/kg, i.m.) y una hora después PPB (178 mg/kg, i.p.) diluido en polietilenglicol (PEG, 30%). Esta dosis de PPB se eligió basándose en experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio para determinar la dosis efectiva 50 para evitar las crisis tónico-clónicas durante el *SE* inducido por litio-pilocarpina (Santana-Gómez, 2012). Ocho horas después de la primera administración de DZP los animales recibieron una segunda dosis del mismo fármaco (1.25 mg/kg, i.m.). La actividad electrográfica del hipocampo se registró durante diferentes intervalos de interés para el análisis de TRF (condición basal, 5 min post establecimiento del *SE* y 60 min post administración de PPB/PEG, ver sección 5.6) (Figura 3).

Veinticuatro horas después de la administración de pilocarpina, los animales se anestesiaron y perfundieron para la realización de los posteriores procedimientos histológicos (tinción de Nissl, Fluoro-Jade B e inmunohistoquímica para NeuN, ver sección 5.9).

6.1.1.2 Grupo *SE*-PEG (vehículo)

Los animales ($n=7$) se manipularon como se describió para el grupo *SE*-PPB (ver sección 6.1.1.1), excepto que, en lugar de PPB se administró PEG (10 ml/kg, i.p.).

6.1.1.3 Grupo control

El grupo de animales control ($n=7$) se manipuló de la misma manera que el grupo *SE*-PEG (ver apartado 6.1.1.2), excepto que, en lugar de administrar cloruro de litio, metiloscoplamina y pilocarpina para la inducción del *SE*, se administró solución salina (1 ml/kg, i.p.) a los tiempos establecidos. Adicionalmente, se realizó la evaluación de la excitabilidad neuronal mediante

el análisis del UPD durante el experimento de microdiálisis (ver sección 5.7) (Figura 3).

6.1.2 Resultados

El análisis histológico mostró que tanto los extremos inferiores de los electrodos, como de las cánulas de microdiálisis en todos los animales implantados se localizaron dentro del hipocampo ventral (Figura 4).

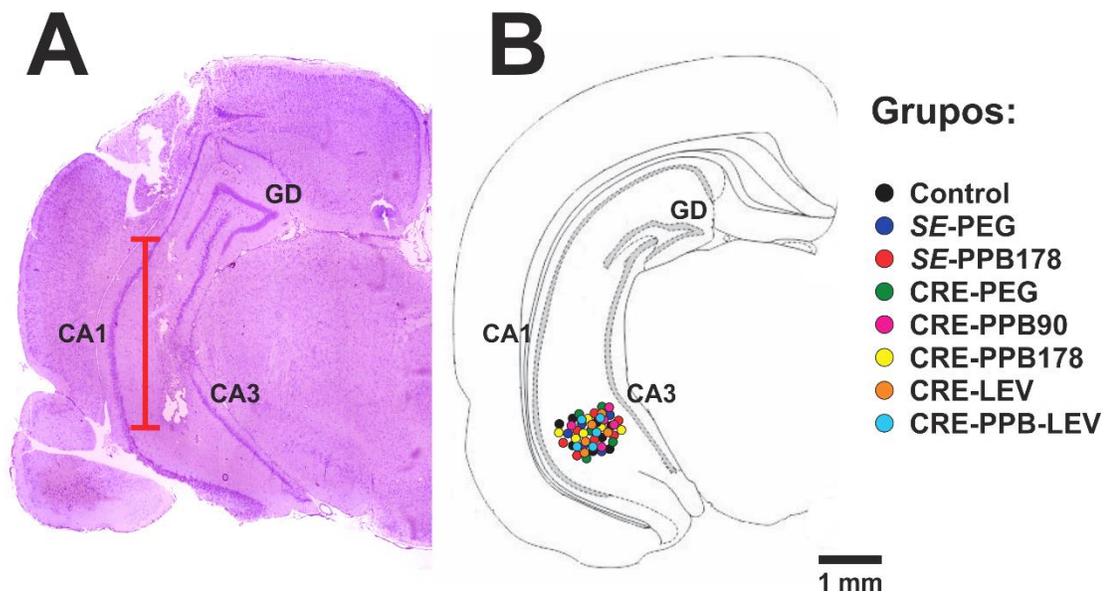


Figura 4. Evaluación histológica de la trayectoria del electrodo bipolar y cánula de microdiálisis. A) Microfotografía representativa de una sección coronal teñida con Nissl mostrando el área de implante del electrodo y cánula en el hipocampo ventral. La línea roja indica la zona activa de la membrana de microdiálisis (3 mm). B) Diagrama a -5.28 mm de bregma (modificado de Paxinos y Watson, 2007) indicando el sitio de implante de la cánula y electrodo bipolar en el hipocampo ventral de los animales utilizados para los diferentes experimentos.

6.1.2.1 Grupo control

En los animales del grupo control ($n=7$) no se observaron cambios electrográficos o de conducta durante los procedimientos experimentales. La actividad electrográfica hipocámpal mostró prevalencia homogénea en todas las bandas analizadas (Figuras 5 y 6). El promedio de los valores de UPD fue

de $301 \pm 35 \mu\text{A}$ y la liberación de glutamato se mantuvo estable a lo largo del experimento de microdiálisis ($1.2 \pm 0.3 \mu\text{M}$) (Figura 7). Derivado de la evaluación del UPD, el 100% de los animales desarrolló crisis fase I en la escala de Racine (Racine, 1972b).

El análisis estereológico mostró la presencia de células inmunopositivas para NeuN en hipocampo dorsal (GD, 5397 ± 331 ; hilus, 1078 ± 19 ; CA1, 1293 ± 59 y CA3, 1442 ± 192 núcleos neuronales por mm^3) y ventral (GD, 3857 ± 375 ; hilus, 1036 ± 38 ; CA1, 1629 ± 73 y CA3, 1161 ± 41 núcleos neuronales por mm^3) (Figuras 8 y 9). Se observaron escasas neuronas en proceso de daño (tinción de Fluoro-Jade B), así como escasa inmunoreactividad para GFAP (Figuras 8 y 13).

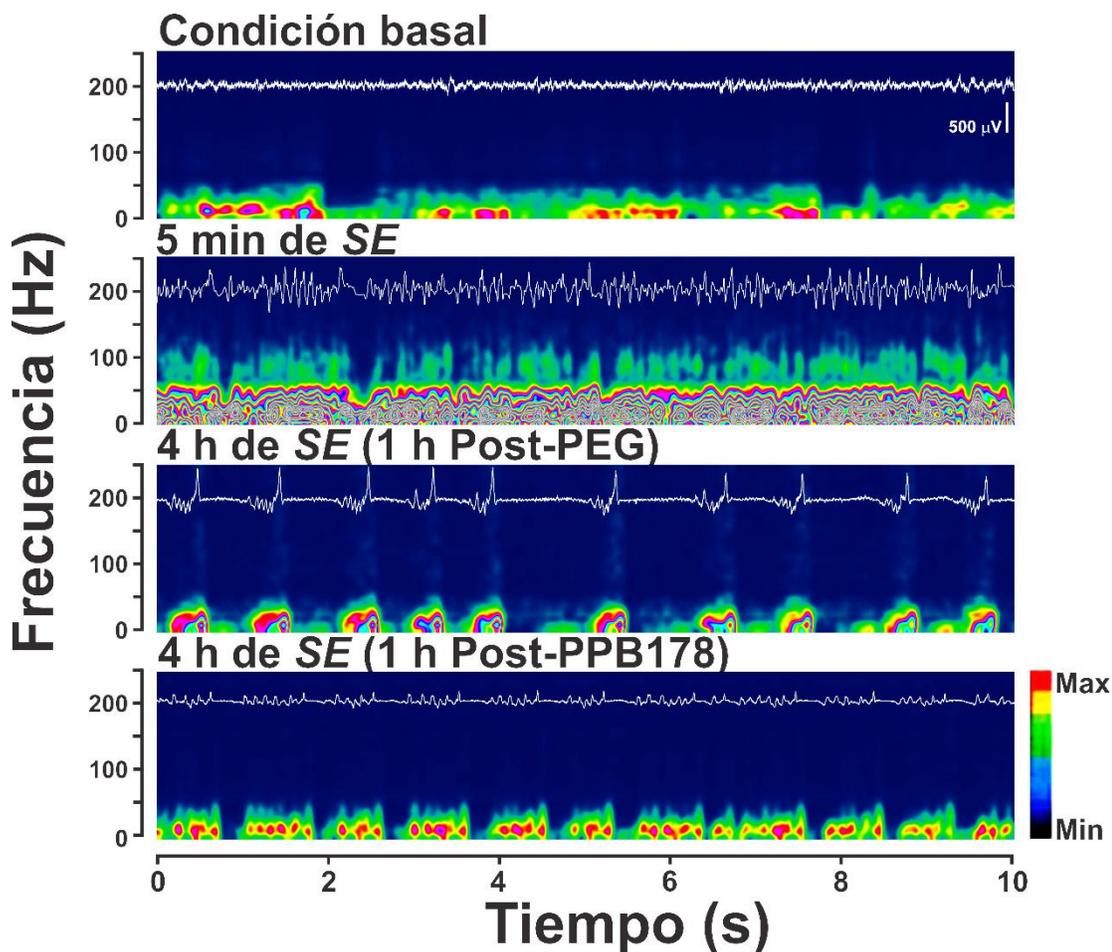


Figura 5. Representación tiempo-frecuencia del espectro de potencia (0.1-250 Hz) y actividad electrográfica hipocámpal bajo distintas condiciones experimentales. Barra de color: Rojo indica actividad de alta energía, mientras que el color azul indica baja energía. En contraste con las condiciones basales (primer panel), se incrementó la potencia en todas las frecuencias 5 min después del inicio del SE (segundo panel). A pesar de la administración de DZP más vehículo (PEG), la actividad de alto voltaje y frecuencia se mantuvo 4 h después del establecimiento del SE (tercer panel). Por el contrario, los animales administrados con DZP más PPB mostraron una disminución de la actividad sincrónica de alta frecuencia 4 h después del inicio del SE (panel inferior).

6.1.2.2 Grupo SE-PEG

En condiciones basales la actividad electrográfica de los animales del grupo SE-PEG fue similar a la observada en el grupo control. Las ratas llegaron al SE 43.2 ± 2.5 min después de la administración de pilocarpina, situación

que se asoció con la presencia de actividad electrográfica caracterizada por espigas rápidas de alto voltaje y un incremento de la potencia espectral en las bandas de 0.1 a 250 Hz ($p < 0.001$, en comparación con las condiciones basales). Después de la primera inyección de DZP los animales mostraron una reducción de la actividad convulsiva que se asoció con la disminución de la amplitud y frecuencia de la actividad epileptiforme, así como una reducción de la potencia relativa en las bandas de 4-8 y 8-13 Hz ($p < 0.001$). Sin embargo, el aumento en las oscilaciones de alta frecuencia (13 a 250 Hz, $p < 0.001$) y la liberación de glutamato (230% mayor que en condiciones basales, $p < 0.001$) fueron evidentes hasta el final del experimento, 5.5 h después del establecimiento del SE (2.5 h después de la administración de PEG) (Figuras 6 y 7).

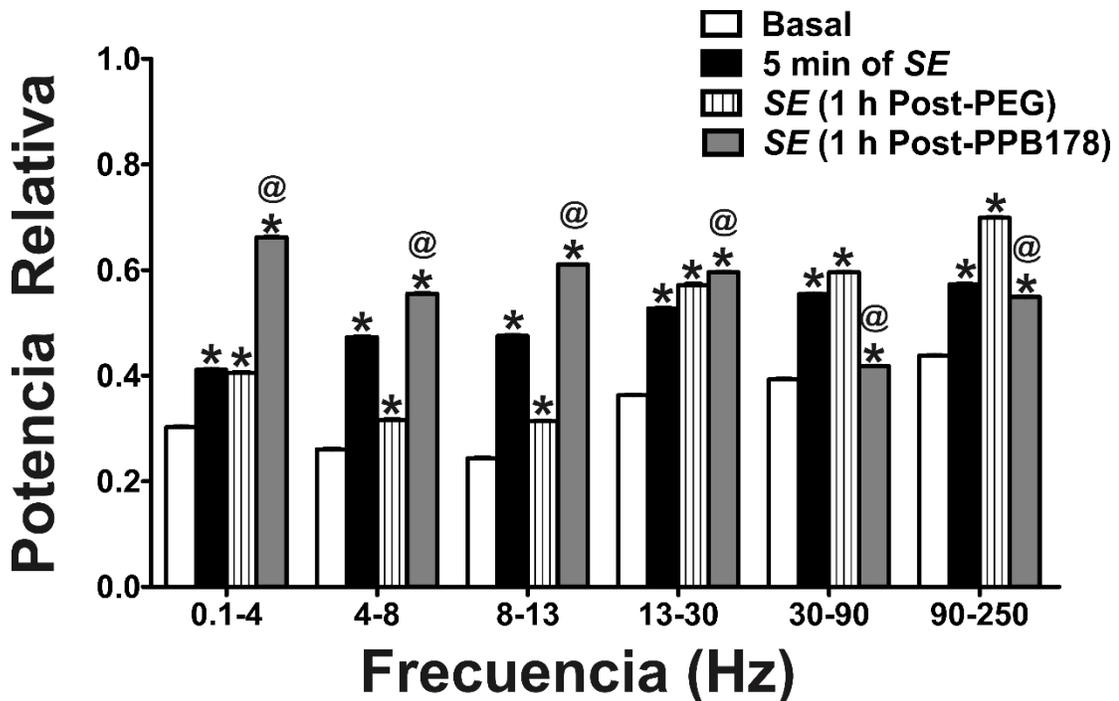


Figura 6. Análisis espectral de la actividad eléctrica del hipocampo en las siguientes condiciones experimentales: Condiciones basales (barras abiertas), 5 min después del establecimiento del SE (barras negras), así como 1 h después de la administración de PEG (barras con líneas verticales) o PPB (barras grises). Nótese el aumento de la potencia relativa de las oscilaciones de baja frecuencia en los animales tratados con DZP más PPB, en contraste con el grupo SE-PEG en el que prevalecieron oscilaciones de alta frecuencia. * $p < 0.001$; en comparación con las condiciones basales; [®] $p < 0.001$; cuando se compara con el grupo SE-PEG. Los valores representan la media \pm EE de la potencia relativa en cada una de las bandas analizadas.

Cuando se comparó con el grupo control, los animales tratados con PEG (grupo SE-PEG) mostraron una disminución en el porcentaje de células inmunoreactivas para NeuN en hipocampo (Dorsal: GD, 29%, $p = 0.0301$; hilus, 47%, $p = 0.012$; CA1, 67%, $p = 0.003$ y CA3, 57%, $p = 0.015$; Ventral: GD, 63%, $p = 0.008$; hilus, 73%, $p < 0.001$; CA1, 65%, $p = 0.002$ y CA3, 64%, $p = 0.013$). En estos animales también se observó un aumento en el número de células positivas para la tinción de Fluoro-Jade B en el hipocampo (Dorsal: GD, 1040.3 ± 829.7 ; hilus, 536.3 ± 182.3 ; CA1, 608.3 ± 271.0 y CA3, 600.9 ± 203.2 neuronas por mm^3 ; Ventral: GD, 671.0 ± 307.3 ; hilus, 429.8 ± 141.7 ; CA1, 634.8 ± 412.6 y CA3, 514.8 ± 148.1 neuronas por mm^3) (Figuras 8 y 9).

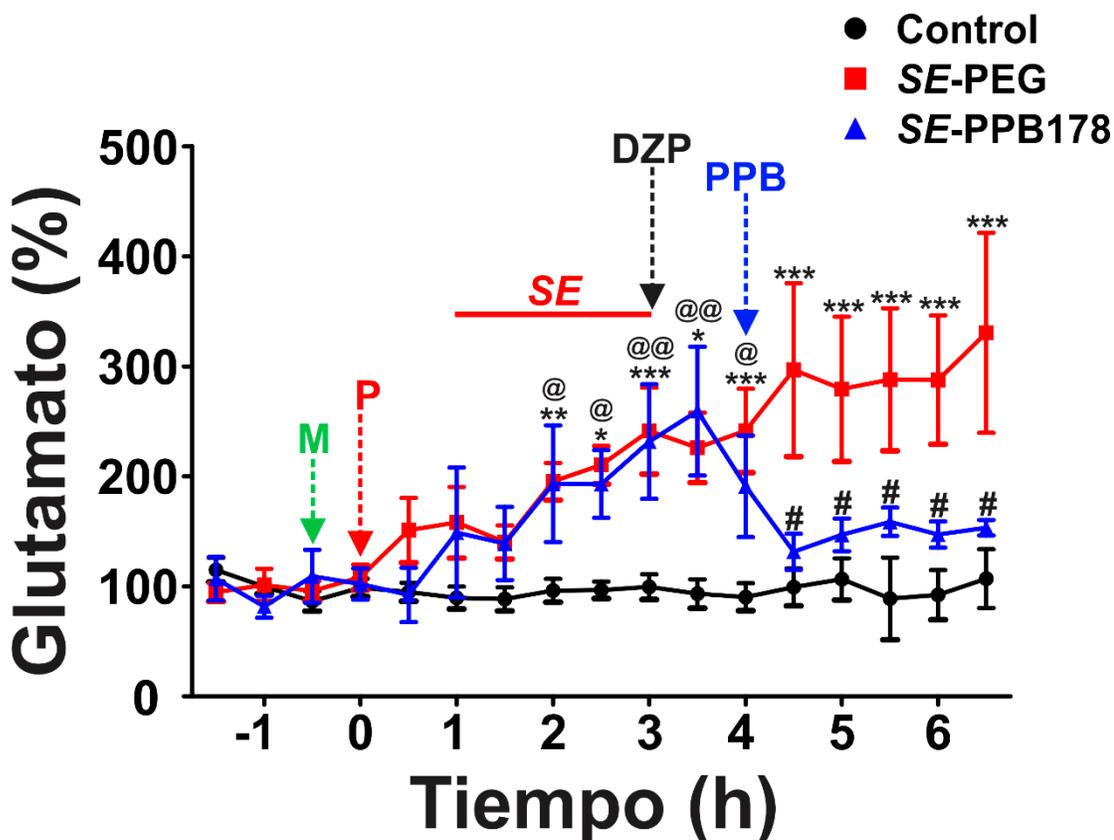


Figura 7. Liberación de glutamato (%) en condiciones basales, durante el SE y después del tratamiento con vehículo (grupo SE-PEG) o PPB (grupo SE-PPB178). En el grupo SE-PEG la liberación de glutamato se incrementó progresivamente después de la administración de pilocarpina efecto que se mantuvo a pesar de la inyección de DZP. Por el contrario, en el grupo SE-PPB178, la administración de PPB después de la inyección de DZP redujo la liberación de glutamato. Los valores representan la media \pm EE del porcentaje de cambio con respecto a la liberación basal. Grupo SE-PEG: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; con respecto a su propio basal. Grupo SE-PPB178: @ $p < 0.01$, @@ $p < 0.001$; en comparación con sus condiciones basales. # $p < 0.001$; con respecto al grupo SE-PEG. M, administración de metilescopolamina; P, administración de pilocarpina; línea roja, periodo de SE; DZP, administración de DZP; PPB, administración de PPB.

6.1.2.3 Grupo SE-PPB178

En el grupo SE-PPB178 las ratas llegaron al SE 40.3 ± 2.0 min después de la administración de pilocarpina. Durante el SE, los animales mostraron un patrón en la liberación de glutamato y actividad electrográfica similar al grupo

SE-PEG. Después de la administración de PPB, se observó una disminución gradual de la actividad epileptiforme. Este efecto se correlacionó con los siguientes cambios: a) Aumento en la potencia relativa de las oscilaciones de baja frecuencia (bandas de 0.1-13 Hz, 1 h después de la administración de PPB, $p < 0.001$); b) reducción en la actividad de alta frecuencia (30-250 Hz, $p < 0.001$) y c) disminución significativa en la liberación de glutamato (126% menor con respecto al grupo SE-PEG, $p < 0.001$). Estos cambios fueron evidentes 30 min después de la administración de PPB y permanecieron hasta el final del experimento (5.5 h después del establecimiento del SE) (Figuras 5-7).

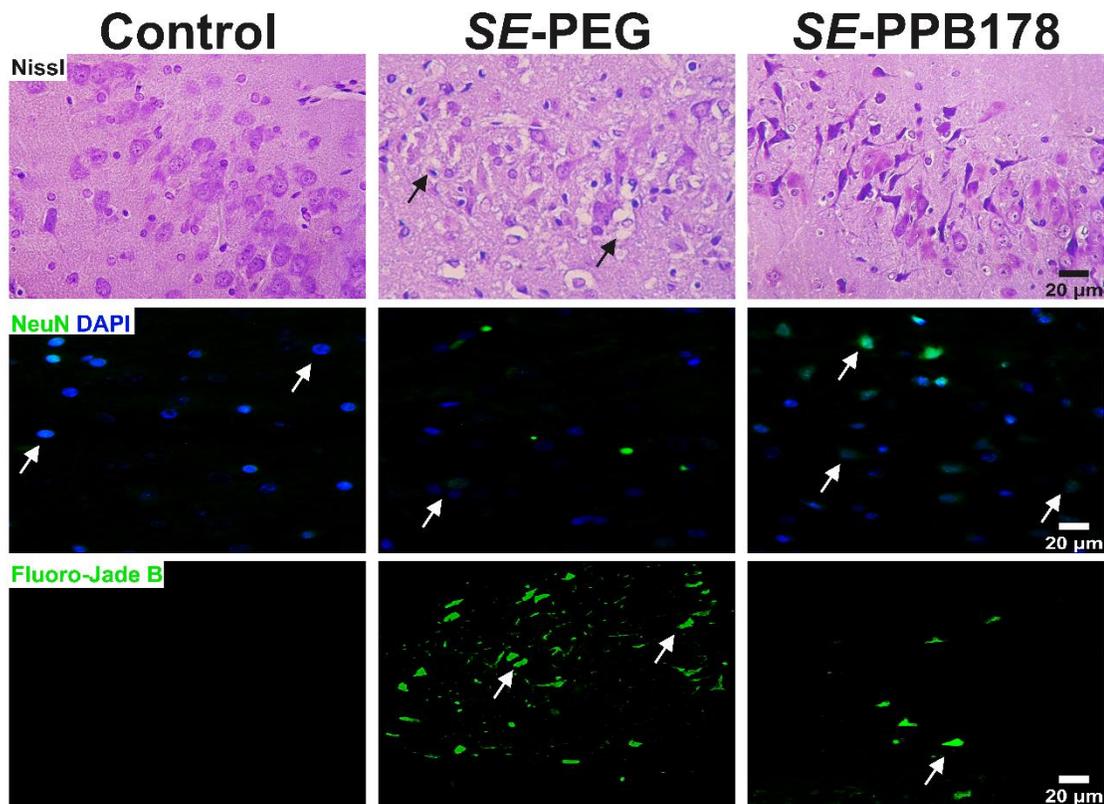


Figura 8. Microfotografías representativas de secciones coronales de hipocampo dorsal a nivel de hilus, del grupo control y de animales que recibieron DZP más vehículo (grupo SE-PEG) o DZP más PPB (grupo SE-PPB178) durante el período post-SE. Las secciones se tiñeron con Nissl (panel superior), inmunohistoquímica para NeuN-DAPI (panel medio) y tinción de Fluoro-Jade B (panel inferior). En

contraste con el tejido control, los animales del grupo SE-PEG mostraron una disminución de la preservación neuronal (NeuN-DAPI, flechas) condición asociada con el incremento del daño neuronal (Fluoro-Jade B, flechas). Estos cambios fueron menos evidentes en las secciones del grupo SE-PPB178.

Cuando se comparó con el grupo SE-PEG, los animales del grupo SE-PPB178, mostraron mayor preservación de núcleos neuronales en el hipocampo (Dorsal: GD, 30%, $p=0.13$; hilus, 115%, $p=0.003$; CA1, 197%, $p=0.004$ y CA3, 170%, $p=0.004$; Ventral: GD, 117%, $p=0.046$; hilus, 245%, $p<0.001$; CA1, 174%, $p=0.003$ y CA3, 171%, $p=0.016$). Además, se observó un menor porcentaje de células en un proceso de muerte (positivas para Fluoro-Jade B) (Dorsal: GD, 81%, $p<0.001$; hilus, 55%, $p<0.001$; CA1, 98%, $p<0.001$ y CA3, 86%, $p<0.001$; Ventral: GD, 70%, $p=0.006$; hilus, 91%, $p<0.001$; CA1, 96%, $p<0.001$ y CA3, 88%, $p=0.004$) (Figuras 8 y 9).

24 h Post-SE

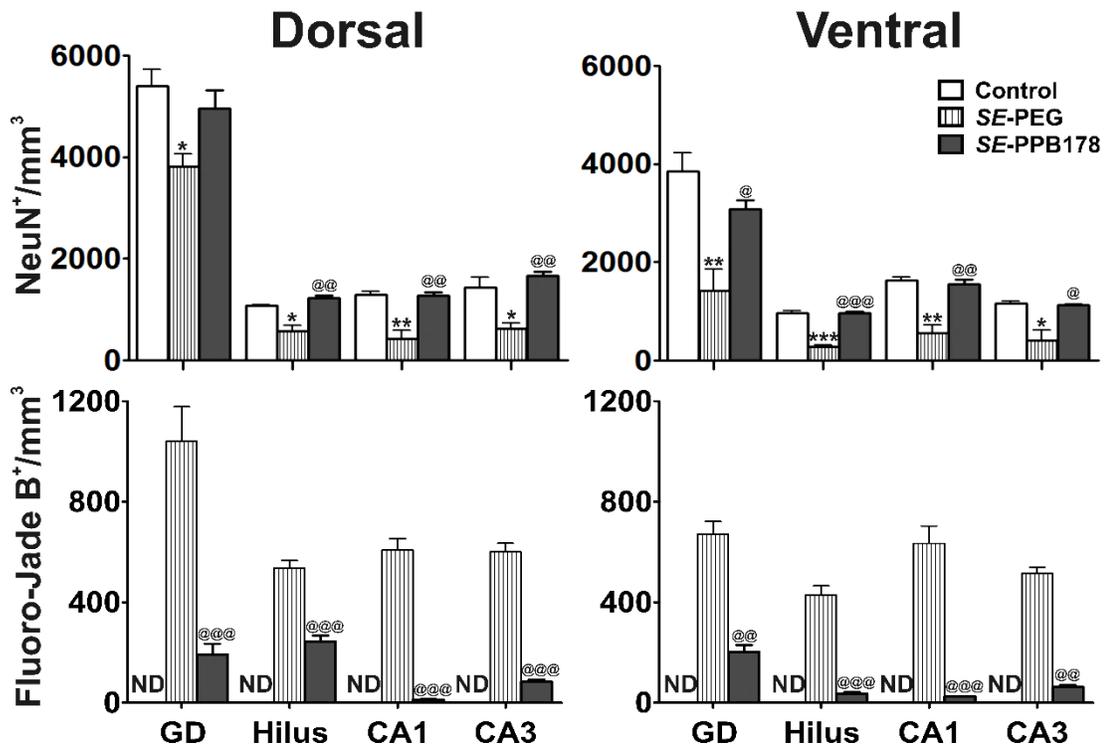


Figura 9. Preservación (panel superior) y daño neuronal (panel inferior) en las regiones dorsal y ventral del hipocampo, evaluado 24 h después del SE. Los animales tratados con PPB después del SE mostraron un incremento en la preservación neuronal (NeuN) y disminución del número de células en proceso de daño (Fuoro-Jade B), con respecto al grupo tratado con vehículo (grupo SE-PEG). Panel superior: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; con respecto al grupo control; @ $p < 0.05$; @@ $p < 0.01$, @@@ $p < 0.001$; con respecto al grupo SE-PEG. Panel inferior: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; con respecto al grupo control. Los valores representan el promedio de daño y preservación neuronal por $\text{mm}^3 \pm \text{EE}$. ND, no determinado.

6.1.3 Discusión

Estudios previos indican que la actividad epileptiforme observada durante el *SE* inducido por la administración de pilocarpina tiene un inicio colinérgico con el subsecuente mantenimiento glutamatérgico (Smolders et al., 1997; Turski et al., 1983). El incremento de la neurotransmisión glutamatérgica durante el *SE* está ampliamente asociada con el proceso de excitotoxicidad mediado por receptores NMDA principalmente en células piramidales y granulares del hipocampo (Fujikawa, 1995; Isokawa y Mello, 1991). El daño neuronal generado durante la actividad epiléptica está involucrado en el desarrollo de CRE (epileptogénesis) y el deterioro cognitivo provocado por el *SE* (Cunha et al., 2009; Roch et al., 2002).

Los resultados mostraron que la administración de DZP combinado con PPB disminuyó el incremento en la liberación de glutamato y la actividad electrográfica inducida por el *SE*. El bloqueo de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje disminuye la liberación de glutamato y atenúa el daño neuronal inducido por isquemia (Calabresi et al., 2003; Xie et al., 1994). Además, estudios previos han demostrado que el PPB es capaz de inhibir los canales de Na⁺ dependientes del voltaje en neuronas piramidales del hipocampo (Lara-Valderrábano et al., 2016). Lo anterior sugiere que el efecto del PPB sobre los canales de Na⁺ puede participar en la disminución de la liberación de glutamato y algunos de los efectos neuroprotectores observados en el presente estudio.

Actualmente se desconoce el tipo de interacción entre el PPB y los canales Na⁺. Sin embargo, considerando la estructura molecular del PPB, este podría compartir mecanismo de acción con la fenitoína, un fármaco que induce efectos anticonvulsivantes y neuroprotectores al bloquear los canales de Na⁺ dependientes de voltaje (Raftopoulos et al., 2016). Los grupos carbonilo y

amino de la fenitoína forman puentes de hidrogeno con la estructura proteica del canal de Na⁺, lo cual le confiere la actividad anticonvulsivante (Poupaert et al., 1984). En cuanto a la estructura molecular de PPB, la presencia de electrones libres en el grupo éster de la molécula (Cashman y Warshaw, 2005), podrían permitir la formación de puentes de hidrogeno con el canal de Na⁺. Lo anterior, apoyaría la hipótesis de que el PPB y la fenitoína pudieran compartir el mecanismo de acción (Enrique et al., *en proceso de publicación*).

Durante el *SE* inducido por la administración de pilocarpina se incrementa la actividad neuronal del hipocampo (Karunakaran et al., 2012; Santana-Gómez et al., 2015). Bajo nuestras condiciones experimentales, se encontró que la administración de PPB durante el *SE* disminuyó las oscilaciones electrográficas de alta frecuencia (90-250 Hz). Un efecto similar es producido por fármacos con efectos sedantes como la ketamina, tiopental y morfina (Faulkner et al., 1998; Whittington et al., 2000). Por otro lado, el análisis de TRF mostró que la administración de DZP más PPB aumentó la potencia de las oscilaciones de baja frecuencia (0.1-30 Hz), efecto asociado con la reducción de la actividad epileptiforme. Se sabe que la actividad theta (4-8 Hz) se incrementa durante los periodos sueño vigilia, así como durante la anestesia inducida por isoflurano o sevoflurano (Bland, 1986; Hagihira, 2015; Whittington et al., 2000). Además, la inducción hipocampal de actividad theta reduce la actividad epileptiforme producida por la inyección intracerebral de penicilina y pentilenetetrazol (La Grutta y Sabatino, 1988; Miller et al., 1994). Estos resultados apoyan la idea de que la prevalencia de oscilaciones de bajas frecuencias puede estar asociada con efectos antiepilépticos (La Grutta y Sabatino, 1988; Miller et al., 1994).

Por otra parte, los parabenos incluyendo el PPB producen efectos estrogénicos débiles (30,000 veces menos potentes que el 17 β-estradiol) (Blair et al., 2000; Routledge et al., 1998). El 17 β-estradiol induce la

neuroprotección en el *SE*, así como, en los modelos de isquemia cerebral (Dubal et al., 1998; Simpkins et al., 1997; Velísková et al., 2000), efecto asociado con mecanismos antioxidantes (Behl et al., 1997), bloqueo de canales Ca^{2+} dependientes del voltaje (Mermelstein et al., 1996) y reducción en la activación de receptores NMDA (Weaver et al., 1997). Considerando lo anterior, es posible considerar que los efectos observados en el presente estudio también podrían estar mediados por la actividad estrogénica del PPB. Sin embargo, se desconoce si estos efectos podrían evitar el desarrollo de epileptogénesis inducido por el *SE*.

6.2 Experimento 2: Evaluación de los efectos del PPB y su combinación con LEV en las consecuencias a largo plazo inducidas por el SE

Durante la etapa crónica del modelo de SE, los animales presentan actividad epiléptica espontánea, una condición asociada con alta excitabilidad neuronal e incremento en la liberación de glutamato, así como daño neuronal y gliosis hipocampal. El presente experimento se diseñó para determinar si la administración subcrónica de PPB y su combinación con LEV durante el período post-SE modifica los efectos a largo plazo inducidos por el SE (Figuras 10 y 16).

6.2.1 Metodología para la evaluación del efecto de distintas dosis de PPB en las consecuencias a largo plazo inducidas por el SE

Protocolo experimental

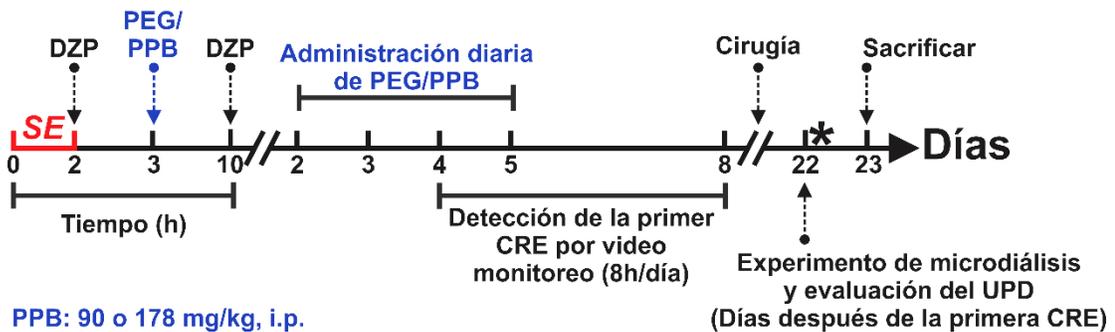


Figura 10. Protocolo experimental para la evaluación de los efectos del PPB en las consecuencias a largo plazo inducidas por el SE. El símbolo (*) indica el periodo de tiempo del registro electrográfico para su posterior análisis.

6.2.1.1 Grupo CRE-PPB178

Posterior al proceso de habituación, los animales se sometieron al SE mediante la administración de litio-pilocarpina ($n=5$) (ver sección 5.3). Dos horas después del inicio del SE, la actividad convulsiva se controló mediante la administración de DZP como se describió anteriormente. Posteriormente (1 h después de la administración de DZP), se comenzó con la administración de

PPB, la cual se repitió durante 5 días (178 mg/kg, i.p., por día). La latencia a la aparición de CRE se determinó a través del video-monitoreo de los animales (8 h/día). Siete días después de la aparición de la primera CRE, las ratas se implantaron con una cánula guía acoplada a un electrodo bipolar para posteriormente, ser sometidas al experimento de microdiálisis (ver sección 5.2). Veintidós días después de la aparición del primera CRE, se realizó el experimento de microdiálisis para determinar la liberación de glutamato durante el período interictal (período de tiempo que existe entre las crisis espontáneas, ver sección 5.4). Durante el experimento de microdiálisis se realizó la evaluación del UPD y se obtuvieron registros electrográficos, los cuales se utilizaron para calcular espectros de potencia mediante TRF (ver secciones 5.6 y 5.7). Veinticuatro horas después del experimento de microdiálisis, los animales se sacrificaron y se obtuvo el cerebro para realizar los procedimientos histológicos posteriores (tinción de Nissl, Fluoro-Jade B e inmunohistoquímica para NeuN-GFAP-DAPI, ver sección 5.8) (Figura 10).

6.2.1.2 Grupo CRE-PPB90

Los animales ($n=6$) se manipularon de la misma manera que el grupo CRE-PPB (ver sección 6.2.1.1), excepto que, en lugar de 178 mg/kg (i.p.) de PPB, se administró una dosis media (90 mg/kg, i.p.) durante 5 días. Veinticuatro horas después del experimento de microdiálisis las ratas se sacrificaron y se obtuvo el cerebro para realizar la evaluación del sitio de implante y daño neuronal (tinción de Nissl y Fluoro-Jade B; respectivamente, ver sección 5.8) (Figura 10).

6.2.1.3 Grupo CRE-PEG

Las ratas ($n=6$) se manipularon de la misma manera que el grupo CRE-PPB (sección 6.2.1.1), excepto que, recibieron administración subcrónica de PEG (10 ml/kg, i.p.) en lugar de PPB.

6.2.2 Resultados

El grupo control correspondió a los animales tratados con solución salina a los tiempos establecidos (ver sección 6.1.2.1).

6.2.2.1 Grupo CRE-PEG

Los animales del grupo CRE-PEG desarrollaron la primera crisis espontánea 4.7 ± 1.6 días después del *SE*. El análisis de la actividad electrográfica durante el período crónico del modelo mostró actividad espontánea de alto voltaje con alta prevalencia en todas las bandas de frecuencia analizadas (Figura 11). Esta condición se asoció con un incremento en la liberación de glutamato (420% en comparación con el grupo control, $p=0.021$) y aumento de la excitabilidad hipocampal revelada por valores bajos de UPD ($36.7 \pm 12.2 \mu\text{A}$, 88% inferior al grupo control, $p<0.001$) (Figuras 12 y 13). Derivado de la evaluación del UPD, el 17% de los animales (1 de 6) presentó crisis fase III, 33% fase IV (2 de 6) y 50% de los animales (3 de 6 animales, $p=0.0329$, con respecto al grupo control) fase V en la escala de Racine (Racine, 1972b).

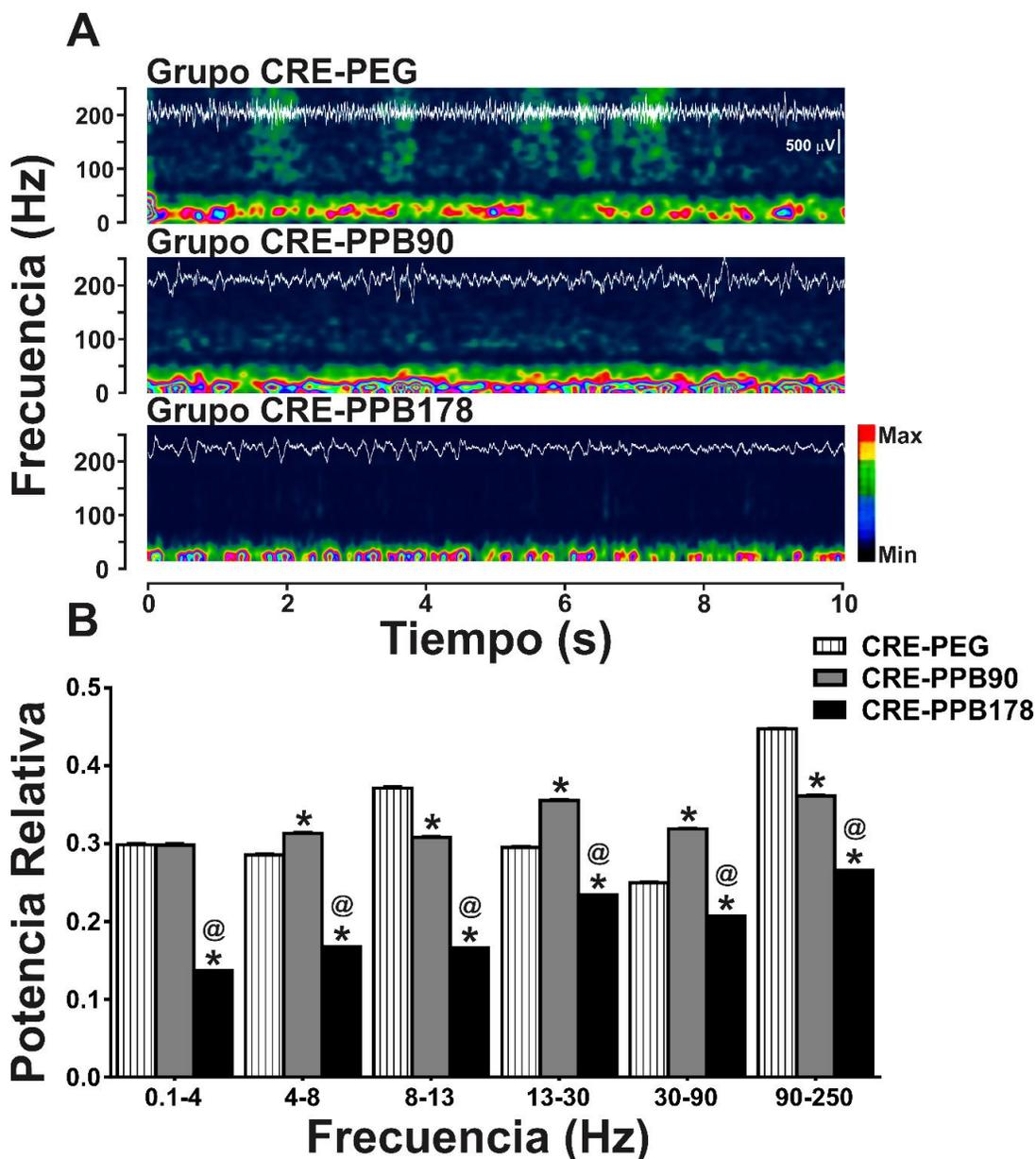


Figura 11. Evaluación de los cambios en la actividad electrográfica durante el periodo interictal de animales tratados con PEG o PPB a distintas dosis. A) Representación tiempo-frecuencia del espectro de potencia (0.1-250 Hz) durante el periodo interictal (grupos CRE-PEG, CRE-PPB178 y CRE-PPB90). Barra de color: Rojo indica actividad de alta energía, mientras que el color azul indica baja energía. Nótese el incremento en todas las frecuencias evaluadas de la actividad eléctrica del grupo CRE-PEG y CRE-PPB90. Estos cambios fueron menos evidentes en los registros obtenidos del grupo CRE-PPB178. B) Representación gráfica del análisis de potencia de la actividad eléctrica del hipocampo durante el período interictal. La actividad electrográfica del grupo CRE-PPB178 (barras negras) fue significativamente menor

cuando se comparó con los grupos CRE-PEG (barras con líneas verticales) y CRE-PPB90 (barras grises). Los valores representan la media \pm EE de la potencia relativa, * $p < 0.001$; con respecto al grupo CRE-PEG; @ $p < 0.001$; con respecto al grupo CRE-PPB90.

El análisis histológico reveló disminución en el porcentaje de células inmunoreactivas para NeuN en el hipocampo (Dorsal: GD, 38%, $p = 0.003$; hilus, 61%, $p = 0.005$; CA1, 77%, $p = 0.001$ y CA3, 54%, $p = 0.005$; Ventral: GD, 65% $p = 0.027$; hilus, 77%, $p = 0.001$; CA1, 73%, $p = 0.001$ y CA3, 66%, $p < 0.001$) con respecto al grupo control (ver sección 6.1.2.1). Además, se observó un elevado número de células positivas para Fluoro-Jade B en el hipocampo (Dorsal: GD, 61 ± 3 ; hilus, 29 ± 23 ; CA1, 244 ± 63 y CA3, 101 ± 12 , células por mm^3 ; Ventral: GD, 56 ± 10 ; hilus, 21 ± 22 ; CA1 836 ± 69 y CA3, 330 ± 66 células por mm^3). Finalmente, los animales mostraron un incremento en la inmunorreactividad para GFAP característica de la astrogliosis en el hipocampo principalmente en la región hiliar (Figuras 14 y 15).

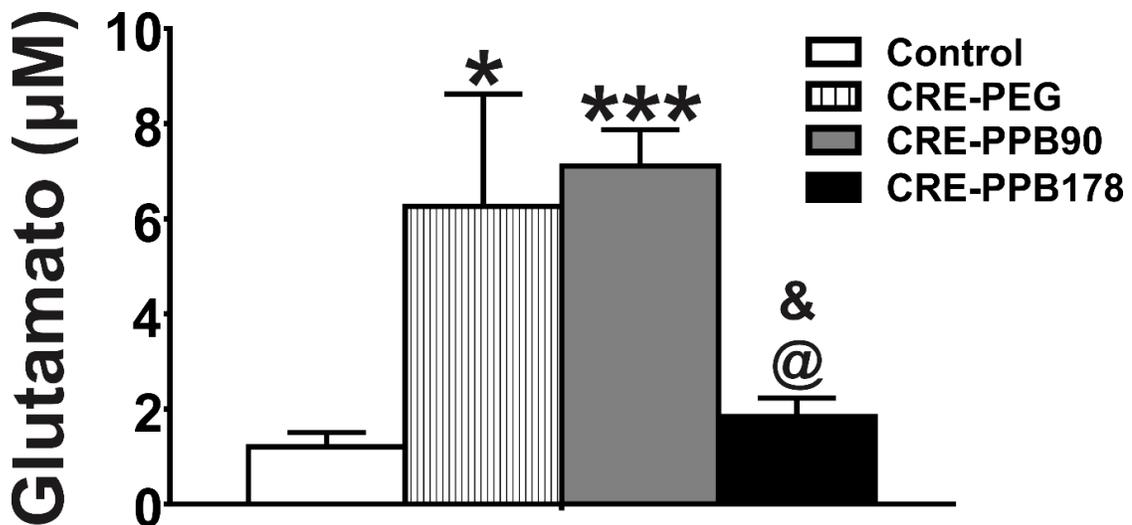


Figura 12. Liberación de glutamato (μM) en el hipocampo de ratas control y durante el período interictal de animales con CRE tratados de forma subcrónica con vehículo o PPB a distintas dosis (grupos CRE-PEG, CRE-PPB178 y CRE-PPB90). En comparación con los grupos control y CRE-PPB178, los animales que recibieron vehículo (grupo CRE-PEG) o la dosis subefectiva de PPB (grupo CRE-PPB90), mostraron un incremento significativo en la liberación de glutamato. Los valores representan la media \pm EE de glutamato (μM). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; en comparación

con el grupo control. @ $p<0.05$; en comparación con el grupo CRE-PEG. & $p<0.05$; en comparación con el grupo CRE-PPB90.

6.2.2.2 Grupo CRE-PPB90

Los animales del grupo CRE-PPB90 desarrollaron la primera CRE 5.2 ± 1.7 días después de SE ($p=0.892$, con respecto al grupo CRE-PEG). El análisis de la actividad electrográfica del hipocampo reveló la prevalencia de oscilaciones en las bandas de 13-30 y 90-200 Hz, pero con una menor potencia relativa en comparación con el grupo CRE-PEG ($p<0.001$) (Figura 11). En cuanto a los experimentos de microdiálisis se observó un incremento en la liberación de interictal de glutamato (483%, $p<0.001$) y excitabilidad hipocampal (84%, $p<0.001$) con respecto al grupo control, valores similares a los observados para el grupo CRE-PEG (Figuras 12 y 13). Posterior a la evaluación del UPD, 60% de los animales desarrollaron crisis fase III (3 de 5) y 40% fase V en la escala de Racine ($p=0.04$ y $p=0.06$, respectivamente; cuando se compara con el grupo control) (Racine, 1972b).

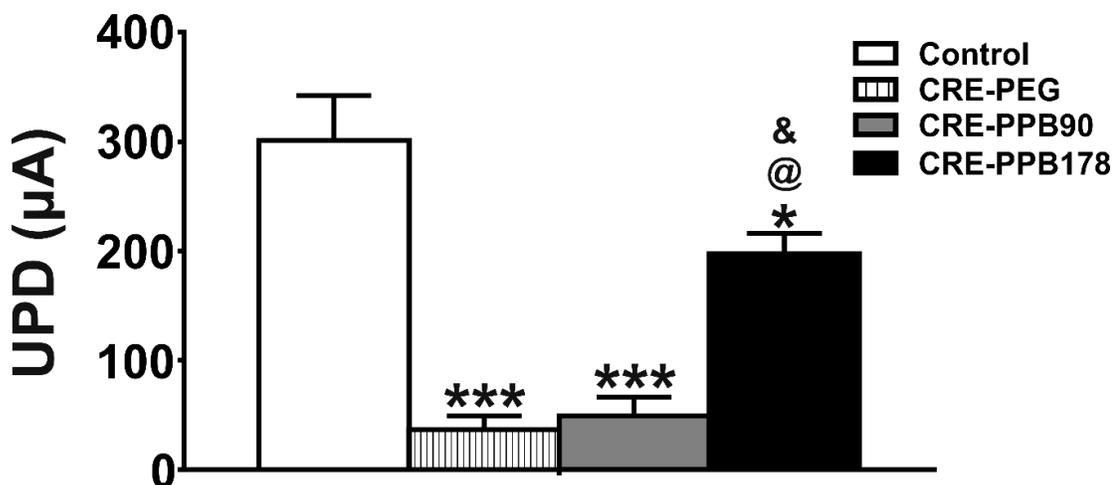


Figura 13. Valores de UPD en condiciones control y durante el período interictal de animales con CRE tratados con vehículo (PEG) o PPB a distintas dosis. Nótese la disminución en la excitabilidad neuronal de los animales del grupo CRE-PPB178, con

*respecto a los grupos CRE-PEG y CRE-PPB90. Los valores representan la media \pm EE de la corriente necesaria para la generación del UPD (μ A). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; en comparación con el grupo control; @ $p < 0.001$ en comparación con el grupo CRE-PPB; & $p < 0.001$; con respecto al grupo CRE-PEG.*

En comparación con el grupo CRE-PEG, los animales tratados con PPB (90 mg/kg; i.p.) no presentaron alteraciones en el número total de neuronas hipocampales (positivas para Fluoro-Jade B) (Figura 15).

6.2.2.3 Grupo CRE-PPB178

Los animales del grupo CRE-PPB presentaron la primera CRE 5.2 ± 1.8 días después del SE ($p = 0.395$, con respecto al grupo CRE-PEG). El análisis de la actividad electrográfica del hipocampo mostró una menor potencia relativa de todas las bandas analizadas ($p < 0.001$; con respecto al grupo control y CRE-PPB90) (Figura 11). En este grupo experimental la liberación de glutamato fue menor a lo mostrado por los grupos CRE-PEG y CRE-PPB90 (71%, $p = 0.035$; 74%, $p = 0.008$; respectivamente) y se observó una disminución en la excitabilidad neuronal revelada por el incremento en los valores de UPD con respecto al grupo CRE-PEG (534%, $p = 0.0003$) y CRE-PPB90 y (403% $p = 0.0005$) (Figuras 12 y 13). Con la evaluación del UPD, el 60% de los animales presentó crisis fase II ($p = 0.06$, con respecto al grupo CRE-PEG) y 40% (2 de 5 animales) crisis fase III en la escala de Racine (Racine, 1972b).

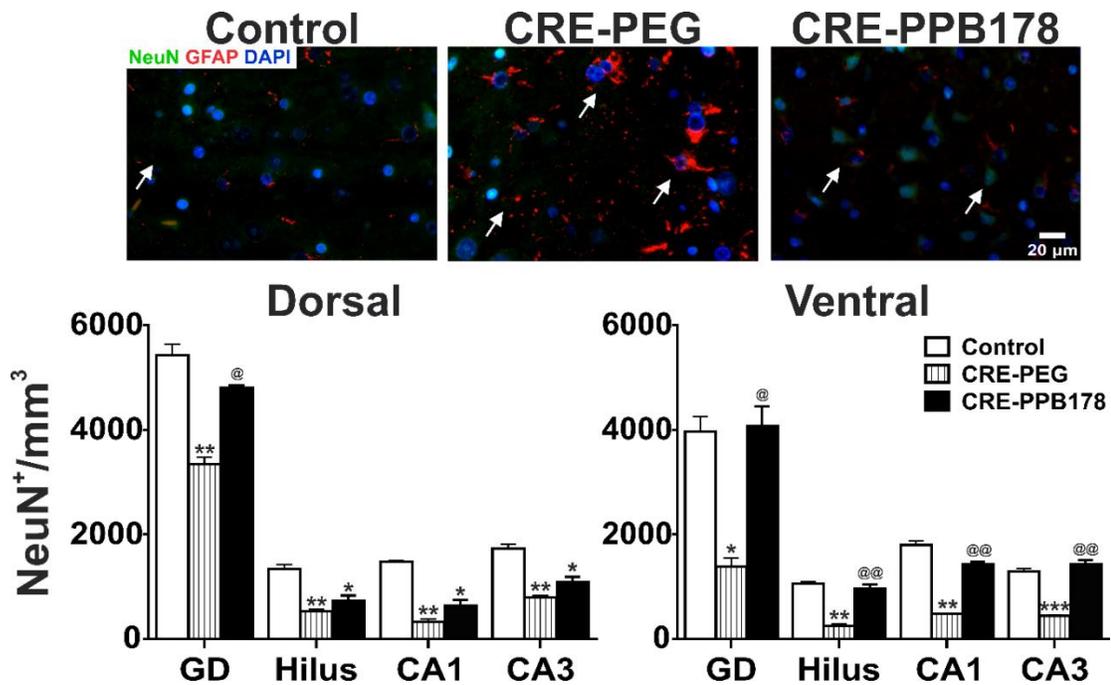


Figura 14. Evaluación de la preservación neuronal y gliosis hipocámpal durante el período crónico del modelo de SE. Panel superior, microfotografías representativas de secciones coronales de hilus en la región dorsal del hipocampo de los grupos control, CRE-PEG y CRE-PPB178. Las secciones se evaluaron mediante la inmunohistoquímica de NeuN-GFAP-DAPI. Nótese la disminución de la densidad neuronal y el aumento de la gliosis (expresión de GFAP) en el grupo CRE-PEG (flechas). Estos cambios fueron menos evidentes en el grupo CRE-PPB178 (flechas). En la parte inferior se muestra la cuantificación neuronal en el hipocampo dorsal y ventral. La región de GD (dorsal y ventral) de los animales tratados con PPB (grupo CRE-PPB178) mostró una preservación neuronal similar al grupo de control. Los valores representan la media \pm EE de células positivas a NeuN por mm^3 . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; en comparación con el grupo de control. @ $p < 0.05$, @@ $p < 0.01$; con respecto al grupo CRE-PEG.

El número de células inmunoreactivas para NeuN y las células marcadas con Fluoro-Jade B en el área de GD (dorsal y ventral) del grupo CRE-PPB fueron similares al grupo de control. Por otro lado, el hipocampo dorsal mostró una disminución en las células inmunoreactivas para NeuN en hilus, CA1 y CA3 (valores similares a los observado en el grupo CRE-PEG). Situación que se correlacionó con un incremento en el número de células teñidas con Fluoro-Jade B en estas áreas. En hilus y CA3, se observó un incremento significativo del daño neuronal con respecto al grupo CRE-PEG

(238%, $p=0.038$ y 206%, $p=0.004$; respectivamente) y CRE-PPB90 (607%, $p=0.0112$ y 500%, $p=0.011$; respectivamente). En cuanto a la región ventral del hipocampo en las áreas de hilus, CA1 y CA3, el número de células inmunoreactivas para NeuN fue similar al grupo control. Sin embargo, la tinción con Fluoro-Jade B mostró un incremento en el número de células en proceso de muerte (valores similares a los grupos CRE-PEG y CRE-PPB90). Por otra parte, la inmunoreactividad para GFAP fue similar a la observada bajo condiciones control (Figuras 14 y 15).

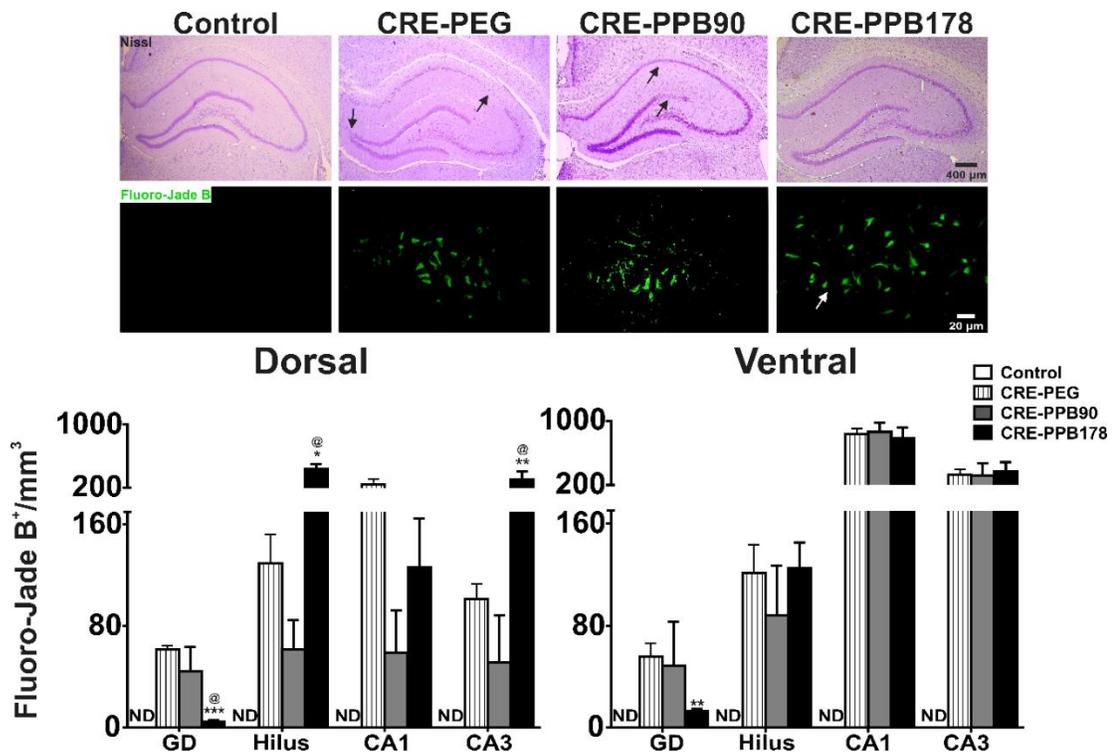


Figura 15. Evaluación del daño neuronal en el hipocampo dorsal y ventral durante el período crónico del modelo de SE. Los animales tratados con vehículo y PPB (90 mg/kg, i.p.), mostraron un incremento en el número de células positivas para Fluoro-Jade B en todas las áreas del hipocampo. La región de GD (dorsal y ventral) de los animales tratados con PPB (178 mg/kg, i.p., grupo CRE-PPB178), reveló una disminución en el número de células en proceso de muerte (positivas para Fluoro-Jade B). Sin embargo, no se observaron cambios en las áreas de hilus, CA1 y CA3. Los valores representan la media \pm EE por de células positivas a Fluoro-Jade B por

mm³. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; en comparación con el grupo CRE-PEG.
@ $p < 0.05$; con respecto al grupo CRE-PPB90. ND, no determinado.

6.2.3 Metodología para la evaluación de los efectos de la combinación de dosis subefectivas de PPB con LEV en las consecuencias a largo plazo inducidas por el SE

La combinación de fármacos con múltiples mecanismos de acción puede ser una estrategia farmacológica adecuada para el control de SE y sus consecuencias (Löscher, 2015). Considerando que la administración subcrónica de PPB (178 mg/kg, i.p.) no evitó el desarrollo de epileptogénesis inducida por el SE, el presente experimento se diseñó para determinar si la administración subcrónica de una dosis subefectiva de PPB con LEV durante el período post-SE modifica los efectos a largo plazo inducidos por el SE (Figura 16).

Protocolo experimental

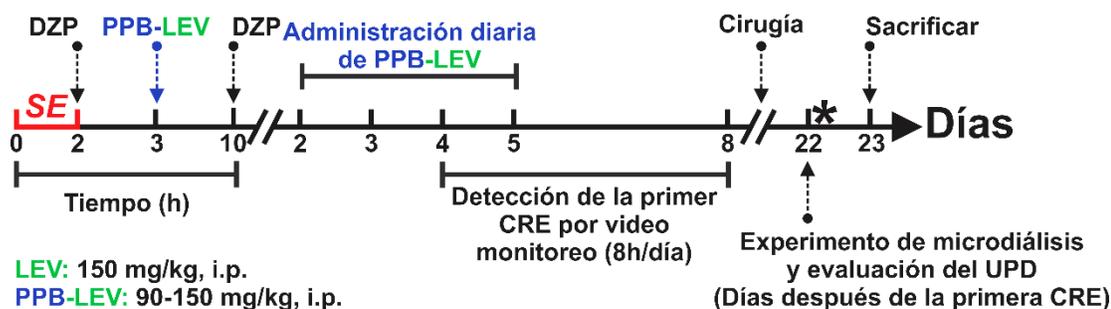


Figura 16. Protocolo experimental para la evaluación de los efectos de la combinación de PPB y LEV en las consecuencias a largo plazo inducidas por el SE. El símbolo (*) indica el tiempo en los cuales se tomó el registro electrográfico de 1 minuto para su posterior análisis.

6.2.3.1 Grupo CRE-PPB-LEV

Los animales ($n=6$) se manipularon de la misma manera que el grupo CRE-PPB178 (apartado 6.2.1.1), excepto que, en lugar de PPB recibieron la combinación PPB-LEV (90-150 mg/kg, i.p.) durante 5 días (Figura 16).

6.2.3.2 Grupo CRE-LEV

Las ratas se ($n=6$) manipularon de la misma manera que el grupo CRE-PPB-LEV (apartado 6.2.3.1), excepto que, en lugar de PPB-LEV se administró LEV (150 mg/kg, i.p.) durante 5 días (Figura 16).

6.2.4 Resultados

6.2.4.1 Grupo CRE-LEV

Los animales del grupo tratado con LEV después del SE (grupo CRE-LEV), presentaron la primera CRE en una latencia similar a la observada para el grupo CRE-PEG (7.3 ± 2.4 días después de SE, $p=0.0679$). El análisis del registro electrográfico por TRF mostró la prevalencia de oscilaciones de alta frecuencia (90-250 Hz) (Figura 17). Durante el período interictal, los experimentos de microdiálisis mostraron una liberación de glutamato de $4.7 \pm 0.3 \mu\text{M}$ (59% menor con respecto al grupo CRE-PEG, $p=0.0088$) (Figura 18). El promedio de los valores de UPD fue de $216.8 \pm 40.3 \mu\text{A}$ (484% mayor, con respecto al grupo CRE-PEG, $p<0.05$) (Figura 19). Derivado de la evaluación del UPD, el 14% de los animales (1 de 7) presentó crisis fase II, 28% fase III (2 de 7) y 57% crisis fase IV (4 de 7 animales, $p=0.0329$ con respecto al grupo CRE-PEG) en la escala de Racine (Racine, 1972b).

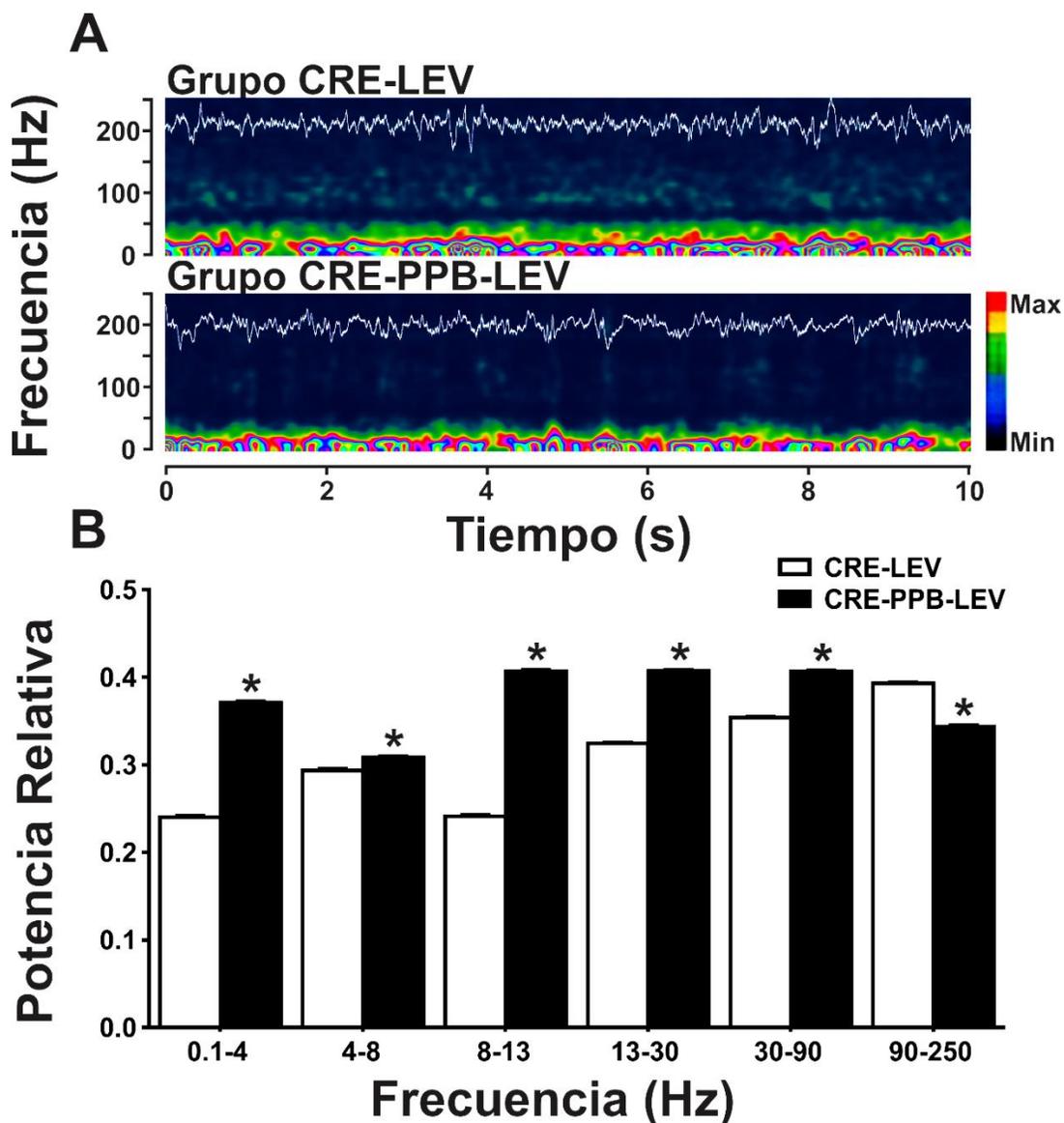


Figura 17. Actividad electrográfica del hipocampo durante el período interictal de animales con CRE tratados con LEV o la combinación PPB-LEV. A) Representación tiempo-frecuencia del espectro de potencia (0.1-250 Hz) de la actividad electrográfica (grupos CRE-LEV y CRE-PPB-LEV). Barra de color: Rojo indica actividad de alta energía, mientras que el color azul indica baja energía. B) Análisis espectral de potencia relativa de la actividad eléctrica del hipocampo durante el período interictal. Nótese el aumento de la potencia relativa de las oscilaciones que van de 0.1-90 Hz y la disminución de la actividad de alta frecuencia (90-250 Hz) en los animales tratados con la combinación PPB-LEV con respecto al grupo CRE-LEV. Los valores representan la media \pm EE de la potencia relativa, * $p < 0.001$; con respecto al grupo CRE-LEV.

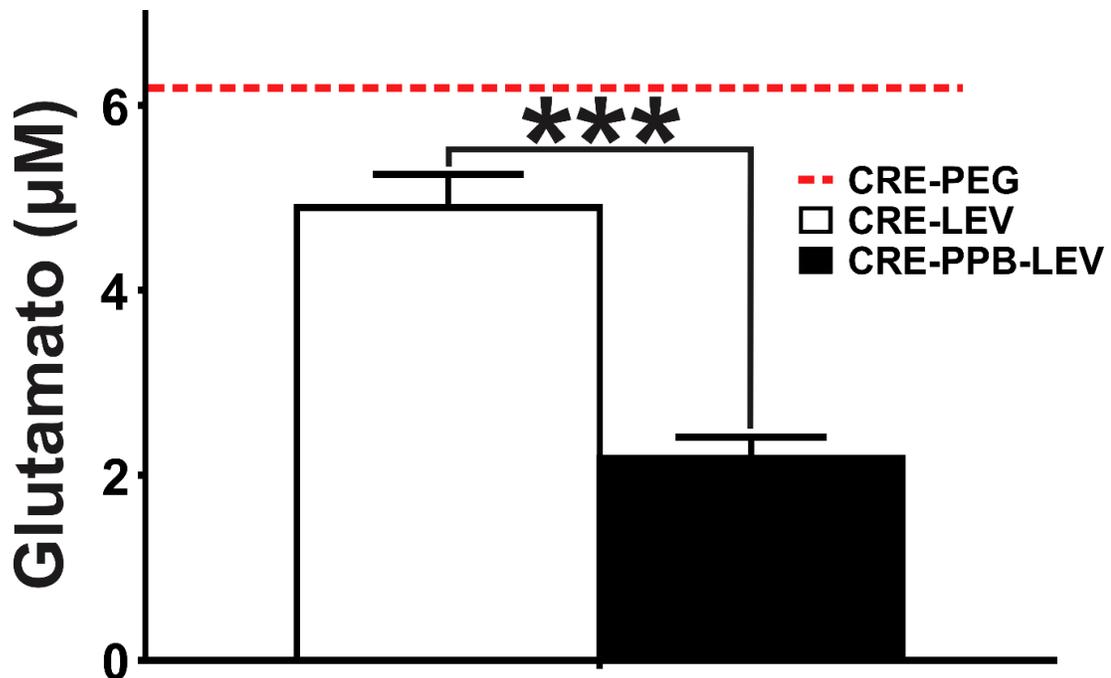


Figura 18. Liberación de glutamato (μM) en el hipocampo de ratas tratadas con LEV o la combinación PPB-LEV durante el periodo interictal secundario al SE. En comparación con el grupo CRE-LEV, los animales tratados con la combinación PPB-LEV presentaron una disminución significativa en la liberación de glutamato. Los valores representan la media \pm EE de glutamato (μM). *** $p < 0.001$. La línea punteada representa los valores basales de glutamato en el grupo control.

El análisis histológico mediante la tinción de Fluoro-Jade B mostró que los animales del grupo CRE-LEV presentaron células en proceso de daño para Fluoro-Jade B en el hipocampo (Dorsal: GD 4.4 ± 2.9 ; hilus, 63.2 ± 7.9 ; CA1, 1.8 ± 1.8 y CA3, 23.5 ± 9.7 ; Ventral: GD, 10.3 ± 5.5 ; hilus, 105.8 ± 56.3 ; CA1, 360.0 ± 114.4 y CA3, 36.7 ± 21.0) (Figura 20).

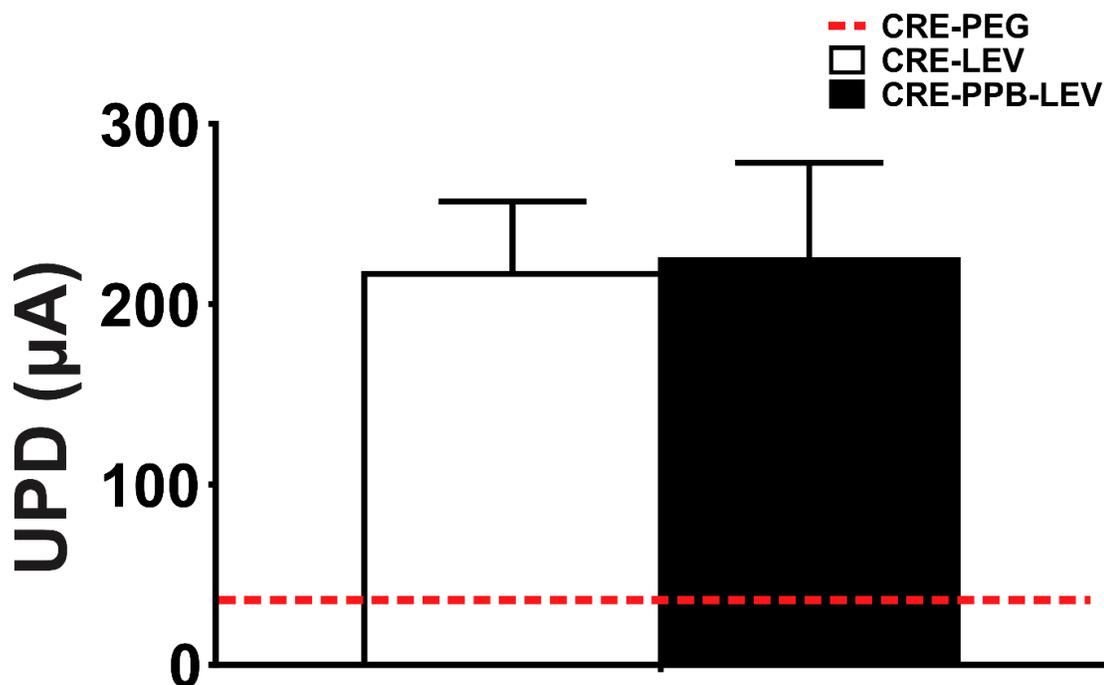


Figura 19. Valores de UPD durante el período interictal de animales con CRE tratados de manera subcrónica con LEV o la combinación PPB-LEV. No se observaron cambios significativos entre los grupos CRE-LEV y CRE-PPB-LEV. Los valores representan la media \pm EE de la corriente necesaria para la generación del UPD (μ A). La línea punteada representa los valores de UPD en el grupo control.

6.2.4.2 Grupo CRE-PPB-LEV

Los animales del grupo CRE-PPB-LEV presentaron la primera CRE 7.5 ± 2.9 días después del SE. El análisis de la actividad electrográfica del hipocampo mostró una prevalencia de oscilaciones de baja frecuencia (bandas 0.1-90 Hz, $p < 0.001$, en comparación con el grupo CRE-LEV). Estos cambios se asociaron con una disminución de la actividad de alta frecuencia (90-250 Hz, $p < 0.001$, con respecto al grupo CRE-LEV) (Figura 17). Los experimentos de microdiálisis mostraron una disminución en la liberación interictal de glutamato (53% menor en comparación con el grupo CRE-LEV, $p < 0.001$). Sin observarse cambios en la excitabilidad neuronal con respecto al grupo CRE-LEV (UPD, $224.5 \pm 53.9 \mu$ A, $p = 0.92$) (Figura 19). Como consecuencia de la

evaluación del UPD, el 50% de los animales presentó crisis fase II (3 de 6 animales), 33% fase III (2 de 6) y 17% fase IV ($p=0.048$ con respecto al grupo CRE-LEV) en la escala de Racine (Racine, 1972b).

El análisis histológico de los animales tratados con la mezcla de PPB-LEV después de la inducción SE, mostró una disminución del daño neuronal (células positivas para Fluoro-Jade B) en el hilus del hipocampo dorsal (55%, $p=0.0372$), así como en las regiones de CA1 y CA3 (80%, $p=0.0370$; 90%, $p=0.0100$; respectivamente) del hipocampo ventral, con respecto a lo observado para el grupo CRE-LEV (Figura 20).

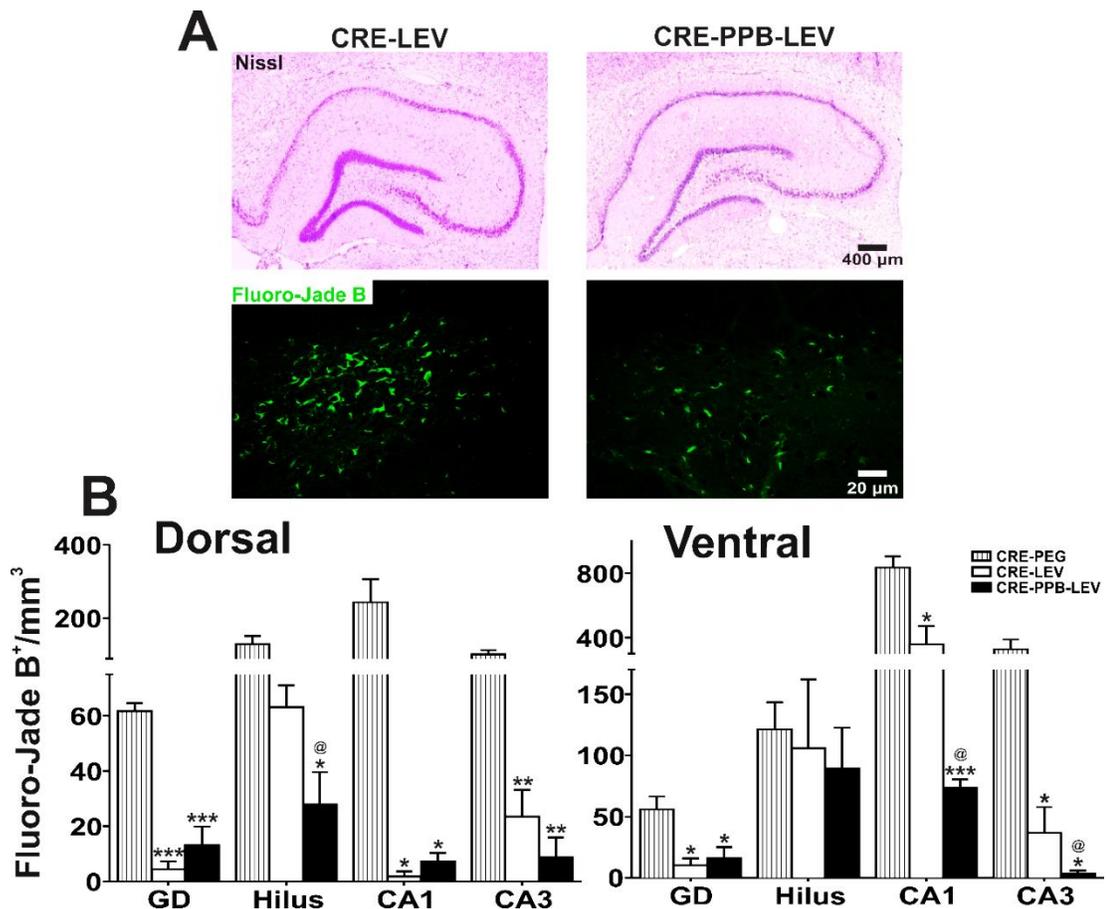


Figura 20. Evaluación del daño neuronal en el hipocampo dorsal y ventral durante el periodo interictal de animales administrados con LEV (grupo CRE-LEV) o la combinación PPB-LEV (grupo CRE-PPB-LEV). A) Microfotografías representativas de

*secciones coronales que muestran la estructura del hipocampo dorsal (tinción de Nissl, panel superior), así como el daño neuronal (Fluoro-Jade B, panel inferior) en el área de hilus. B) Representación gráfica del daño neuronal en el hipocampo dorsal y ventral. Los valores representan la media \pm EE por de células positivas a Fluoro-Jade B por mm³. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; en comparación con el grupo CRE-PEG; @ $p < 0.05$; con respecto al grupo CRE-LEV.*

6.2.5 Discusión

En el presente estudio se observó que la administración subcrónica de PPB no evitó el desarrollo CRE. Sin embargo, la administración de 178 mg/kg de PPB (i.p.) disminuyó la liberación interictal de glutamato, efecto asociado con una menor excitabilidad neuronal y neuroprotección restringida a GD. En cuanto a los animales tratados con la combinación de PPB-LEV se observó una disminución en el daño neuronal y en la liberación de glutamato (con respecto a las ratas tratadas solo con LEV).

La esclerosis hipocampal durante el proceso de epileptogénesis, consiste en un patrón característico de pérdida neuronal en las regiones de GD, hilus, CA1 y CA3. Este daño se encuentra asociado con la presencia de hiperplasia astrogliar y reborización axonal (Löscher y Brandt, 2010; Sloviter, 1999). Es importante destacar que durante el proceso de epileptogénesis, las células granulares de GD presentan un incremento en la neurotransmisión glutamatérgica mediada principalmente por el receptor NMDA, así como un aumento en la unión de receptores a benzodiazepinas/GABA_A (Kamphuis et al., 1995; Rocha y Ondarza-Rovira, 1999; Scimemi et al., 2006). Es posible sugerir que debido a los efectos estrogénicos inducidos PPB (178 mg/kg, i.p.), este pueda interactuar con el receptor a benzodiazepinas/GABA_A en las células granulares del GD de animales con CRE, incrementando la neurotransmisión GABAérgica, lo cual se refleja con el efecto neuroprotector selectivo. La neuroprotección inducida por PPB, mantiene la idea del papel del GD como una compuerta que impide la propagación de la actividad epiléptica

desde el hipocampo a otras áreas cerebrales (Cohen et al., 2003; Krook-Magnuson et al., 2015).

Por otro lado, la administración subcrónica de PPB durante el período post-*SE* no evitó el daño neuronal en hilus, CA1 y CA3, así como la aparición de CRE durante el período crónico del modelo. Nuestros datos son consistentes con el daño celular encontrado después de la administración subcrónica de FAE como vigabatrina, LEV, topiramato y DZP en animales sometidos a *SE* (André et al., 2001; Cunha et al., 2009; Rigoulot et al., 2004). Sin embargo, es necesario realizar experimentos enfocados en evaluar si la administración de dosis altas de PPB puede inducir efectos neuroprotectores en todas las áreas del hipocampo y así evitar el desarrollo de CRE después del *SE*.

Con respecto a la actividad glial, estudios previos han demostrado que estas células juegan un papel importante en la generación y propagación de la actividad epiléptica, contribuyendo a la generación de la despolarización paroxística de las neuronas a través de la liberación de glutamato (Coulter y Steinhäuser, 2015; Seifert y Steinhäuser, 2013; Tian et al., 2005). Es posible considerar que la disminución en la liberación de glutamato observada (grupos CRE-PPB178 y CRE-PPB-LEV), sea a causa de la reducción de la expresión glial en el hipocampo, efecto asociado con una disminución en el daño neuronal observado. Sin embargo, estos cambios también podrían reflejar un incremento de la recaptura de glutamato mediada principalmente por los cotransportadores (EAAT), así como alteraciones en su metabolismo (Eid et al., 2004).

Durante el proceso de epileptogénesis secundario al *SE* se presenta actividad de alta frecuencia en el hipocampo (90-250 Hz) que habitualmente antecede la aparición de las crisis epilépticas (Bragin et al., 2004; Lévesque

et al., 2015, 2011). Nuestros resultados mostraron una disminución de la actividad de alta frecuencia, efecto que se asoció con la reducción de la excitabilidad neuronal (valores altos de UPD). Con base en lo anterior, podemos sugerir que la supresión de las oscilaciones de alta frecuencia y la excitabilidad neuronal inducida por la administración de PPB (178 mg/kg, i.p.), podría representar una estrategia farmacológica para evitar las consecuencias de la actividad epiléptica.

El LEV es un fármaco de nueva generación que ha sido ampliamente utilizado en diversos modelos animales. La administración subcrónica de LEV retarda el desarrollo de CRE, disminuye el daño neuronal en las regiones de hilus, CA1 y CA3 del hipocampo; además de reducir la excitabilidad neuronal (Margineanu et al., 2008; Yan et al., 2005; Zhou et al., 2007). En el presente estudio, se observó que la combinación de PPB-LEV (90-150 mg/kg, i.p.) disminuyó significativamente el daño neuronal en hilus (hipocampo dorsal) y las áreas de CA1 y CA3 de hipocampo ventral, con respecto a los animales tratados solamente con LEV. Sin embargo, la combinación PPB-LEV no evitó el desarrollo de CRE. Las diferencias en el efecto neuroprotector observado se derivan de la susceptibilidad diferencial de las neuronas del hipocampo a distintos tipos de daño. Específicamente, las neuronas del hilus, CA1 y CA3 son vulnerables a los daños inducidos por las crisis convulsivas inducidas por distintos modelos animales (Borges et al., 2003). Estos hallazgos indican que la coadministración de estos fármacos incrementa los efectos neuroprotectores asociados a una disminución en la liberación de glutamato. Sin embargo, son necesarios más experimentos para encontrar una combinación óptima que evite el desarrollo de CRE.

Por otro lado, durante la inducción de crisis parciales (fases I-II) existe un incremento en la actividad metabólica en estructuras como corteza entorrinal, corteza piriforme, septum medial y la región límbica anterior (lo cual

refleja un incremento en la actividad de estas áreas). En cuanto a las crisis generalizadas (fases: III-V), el patrón de respuesta consiste en incrementos de la actividad metabólica bilateral del hipocampo, corteza entorrinal y estructuras extrahipocampales como tálamo, sustancia nigra y neocorteza frontoparietal, que en su conjunto presentan proyecciones descendentes que inervan a motoneuronas (Engel et al., 1978; Iadarola y Gale, 1982; Miller et al., 1987). En este estudio se observó que después de la evaluación del UPD, los animales tratados con la combinación PPB-LEV desarrollaron crisis fase II y III en la escala de Racine (Racine, 1972b), en comparación con los animales del grupo CRE-LEV y CRE-PEG que se mantuvieron en fases IV y V. Considerando la posible interacción del PPB con el receptor GABA_A, es posible sugerir que la reducción de crisis generalizadas después de la evaluación del UPD podría ser resultado de la actividad inhibitoria del PPB en regiones extrahipocampales como el tálamo o la sustancia nigra que se han descrito como esenciales en la propagación anatómica de las crisis convulsivas (Lothman et al., 1991).

En la actualidad, el PPB se utiliza como conservador en algunas formas farmacéuticas orales de FAE, tales como: LEV (Keppra), carbamazepina (Tegretol), Oxcarbazepina (Trileptal), DZP (Actavis, UK LTD) y gabapentina (Rosemont Pharmaceuticals Limited) (EMC, 1999). Teniendo en cuenta que el PPB induce efectos inhibidores en el SNC (Lara-Valderrábano et al., 2016; Matthews et al., 1956), es posible proponer que su combinación con los FAE, pueda resultar en una terapia más eficaz para reducir la actividad epiléptica. Sin embargo, son necesarios experimentos adicionales para apoyar esta hipótesis.

Desde hace algunos años existe el debate acerca de si la combinación de FAE con diferentes mecanismos de acción pueden ser más beneficiosos que la farmacología dirigida a un solo blanco (Deckers et al., 2000; Jonker

et al., 2007). Aunque se pueden encontrar ejemplos que apoyen ambos escenarios, parece que, la combinación de dos fármacos con distintos mecanismos de acción pueden proporcionar un mayor beneficio que el de dos fármacos que actúan sobre el mismo blanco terapéutico (Cunha et al., 2009; Löscher y Hönack, 1994; Mazarati et al., 2004). En este contexto, el incremento en los efectos antiepiléptogénicos mostrado por el tratamiento con PPB-LEV podrían ofrecer una alternativa farmacológica para el tratamiento inicial del SE. Sin embargo, las combinaciones de FAE deben de ser cuidadosamente seleccionadas basándose en el potencial de sinergia, la asociación con interacciones farmacocinéticas desfavorables y toxicidad (Kaminski et al., 2009).

6.3 Experimento 3: Evaluación de los efectos tóxicos inducidos por la administración subcrónica de PPB y su combinación con LEV

La administración subcrónica de distintos FAE induce la exacerbación de los efectos tóxicos, los cuales se reflejan con alteraciones en el funcionamiento de las principales vías metabólicas. El presente experimento se diseñó para determinar si la administración subcrónica de PPB y su combinación con LEV modifica la actividad motora, daño renal y hepático de ratas sanas (Figura 21).

6.3.1 Metodología general

A continuación, se describe la metodología general para la realización del experimento 3.

6.3.1.1 Prueba de campo abierto

Con el propósito de evaluar el efecto de los distintos tratamientos en la actividad motora de los animales se llevó a cabo la prueba de campo abierto. Esta prueba consistió en colocar al roedor en una de las esquinas de una caja de acrílico (50 x 33 x 45 cm) dividida en 12 cuadrantes iguales. Inmediatamente después, se comenzó a contar el número de veces que el animal cruzó con las 4 patas cada uno de los cuadrantes durante un periodo de 5 min (Prut y Belzung, 2003). Los valores de actividad motora se analizaron mediante la prueba de ANOVA de una vía seguida por una prueba post-hoc LSD de Fisher y se expresaron como la media \pm EE del número de cruces durante 5 min.

6.3.1.2 Evaluación del tejido renal y hepático

Para el análisis del tejido renal y hepático se obtuvieron cortes transversales de 5 μ m de espesor.

6.3.1.2.1 Tinción de hematoxilina-eosina

La hematoxilina es un colorante catiónico o básico, que tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura (p. ej. núcleos celulares). Por su parte la eosina es un colorante que tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa (p. ej. proteínas citoplasmáticas), gracias a su naturaleza aniónica o ácida (Luna, 1968).

Para realizar esta tinción los cortes de tejido renal y hepático se manipularon de igual manera que en el apartado 5.8.2.1, excepto que después de rehidratar, las muestras se sumergieron en hematoxilina durante 10 min. Posteriormente, se lavaron con agua destilada para eliminar los excesos de colorante y se pasaron rápidamente por alcohol ácido (28 ml de etanol al 50% + 1.2 ml de ácido clorhídrico concentrado). Las laminillas se lavaron nuevamente y se sumergieron en eosina durante 30 s. Los cortes se deshidrataron utilizando concentraciones crecientes de alcohol (70%, 96%, 100%) y por último en xileno (5 min en cada solución). Las muestras se cubrieron con resina sintética y se analizaron a través de un microscopio óptico.

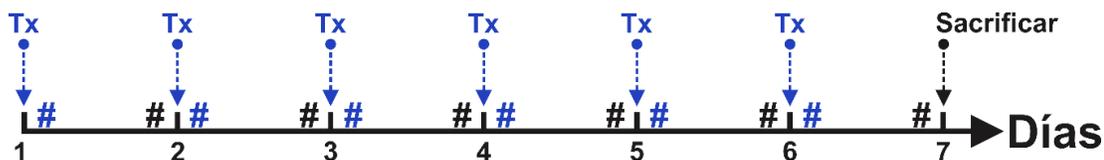
6.3.1.2.2 Tinción de rojo oleoso

El rojo oleoso es un colorante soluble en grasas que se utiliza para la tinción de lípidos y triglicéridos neutros. Se utilizaron cortes de tejido hepático en congelación, los cuales se sumergieron en isopropanol al 60% durante 5 min. Posteriormente, las muestras se incubaron en la solución de trabajo de rojo oleoso durante 15 min a temperatura ambiente (25-28 °C). Después, se enjuagaron con isopropanol al 60% y agua destilada (5 min en cada solución). Las laminillas se contrastaron con hematoxilina (2 a 3 min); después, se lavaron con agua destilada para eliminar los excesos de colorante y se

pasaron rápidamente por alcohol ácido (28 ml de etanol al 50% + 1.2 ml de ácido clorhídrico concentrado). Los cortes se lavaron con agua destilada, se dejaron secar y finalmente se montaron con glicerina para ser analizados a través de un microscopio óptico.

6.3.2 Metodología para la evaluación de los efectos en la actividad motora, daño renal y hepático de ratas sanas inducidos por la administración subcrónica de PPB y su combinación con LEV

Protocolo experimental



Tx: PEG 30%, PPB (90 o 178 mg/kg), LEV (150 mg/kg), PPB-LEV (90-150 o 178-150 mg/kg)

Figura 21. Protocolo experimental para la evaluación de los cambios en la actividad motora, daño renal y hepático, inducido por la administración subcrónica de PPB y su combinación con LEV en ratas sanas. Tx, tratamiento; #, evaluación de la actividad motora 30 min después de cada tratamiento; #, evaluación de la actividad motora 23 h después de cada tratamiento.

6.3.2.1 Grupos PPB

Veinticuatro horas después de la última inyección de solución salina (habitación), se inyectó PPB (90 o 178 mg/kg, i.p.; $n=4$ por dosis) repitiendo la administración cada 24 h durante 6 días. La evaluación de la actividad motora mediante la prueba de campo abierto se realizó media hora y 23 h después de cada tratamiento (ver sección 6.3.1.1) (Figura 21).

Inmediatamente después de la última evaluación conductual (día 7), los animales se perfundieron para el posterior análisis histológico del tejido renal y hepático mediante las tinciones de hematoxilina-eosina y rojo oleoso (ver sección 6.3.1.2) (Figura 21).

6.3.2.2 Grupo LEV

Este grupo se manipulo como el grupo tratado con PPB (ver apartado 6.3.2.1), excepto que, se administró LEV (150 mg/kg, i.p.) en lugar de PPB ($n=4$).

6.3.2.3 Grupos PPB-LEV

Los animales se manipularon como el grupo PPB (ver apartado 6.3.2.1), excepto que, se administró la combinación PPB-LEV (90-150 o 178-150 mg/kg, i.p., $n=4$ por dosis) en lugar de PPB.

6.3.2.4 Grupo control

Las ratas del grupo control se manipularon de la misma manera que los animales del grupo PPB (ver apartado 6.3.2.1), con la excepción de que se administró PEG (10 ml/kg, i.p., $n=4$) en lugar de PPB.

6.3.3 Resultados

6.3.3.1 Grupo control

En las ratas del grupo control la administración subcrónica de PEG no indujo cambios significativos en la actividad motora evaluada media hora después de cada administración. El promedio de cruces entre cuadrantes durante 6 evaluaciones fue de 43.9 ± 2.9 . Estos valores se mantuvieron constantes en las pruebas realizadas 23 h después de cada administración (42.5 ± 3.5 , cruces entre cuadrantes) (Figuras 22 y 23).

El análisis histológico del tejido renal mostró la presencia de túbulos contorneados proximales y distales (medula renal) de características histológicas normales (Figura 24). En cuanto a la histología del tejido hepático,

se observó una arquitectura lobulillar clásica conformada por hepatocitos en disposición hexagonal sin aparentes cambios morfológicos inducidos por la administración subcrónica de PEG. No se observaron depósitos de lípidos evaluados mediante la tinción de rojo oleoso (Figuras 25 y 26).

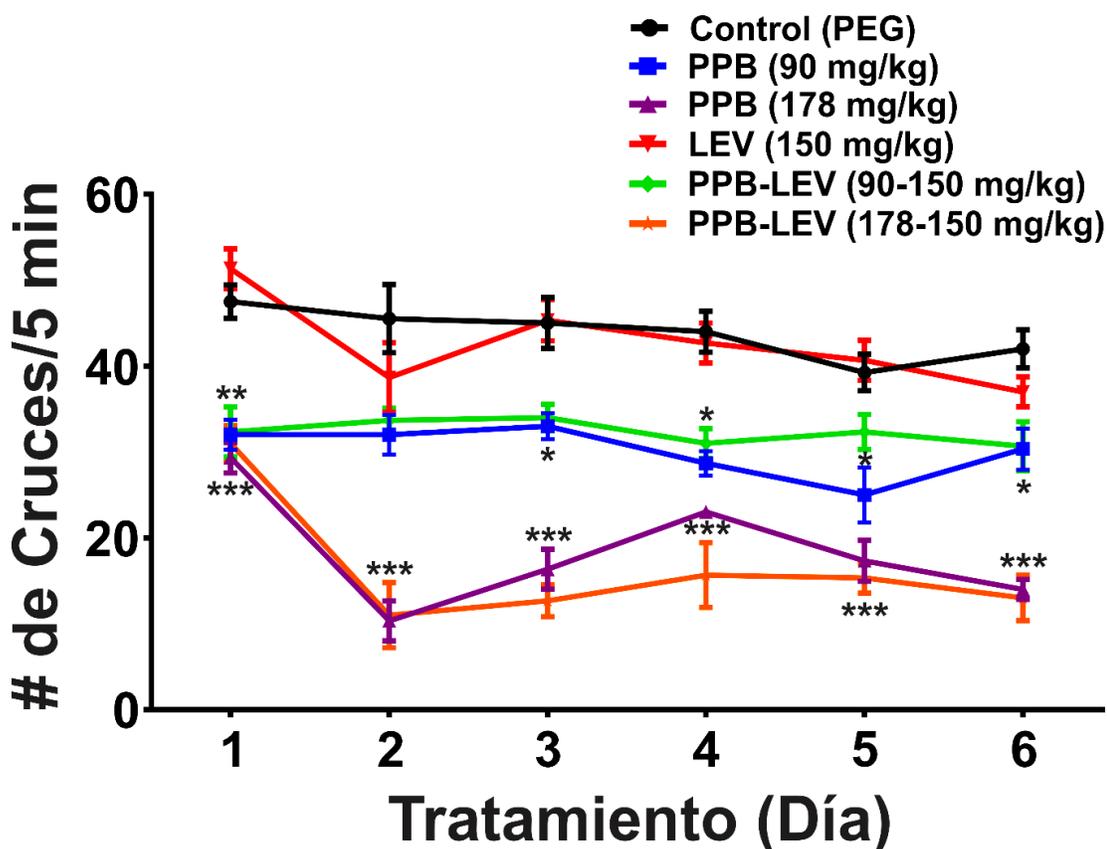


Figura 22. Evaluación de la actividad motora media hora después del tratamiento con PPB, LEV o la combinación PPB-LEV. El tratamiento con ambas dosis de PPB (90 o 178 mg/kg, i.p.), así como su combinación con LEV disminuyó de manera significativa la actividad motora en la prueba de campo abierto. Los valores representan el promedio del número (#) de cruces entre los cuadrantes \pm EE de la media, evaluados durante 5 min por día. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$; con respecto al grupo control (PEG).

6.3.3.2 Grupos tratados con PPB

Las ratas tratadas con ambas dosis de PPB (90 o 178 mg/kg, i.p.) mostraron una disminución significativa de la actividad motora, efecto que fue

más evidente en el grupo tratado con 178 mg/kg (i.p.) (40% menor con respecto al grupo control, $p < 0.001$). La disminución de la movilidad inducida por la administración de PPB (90 o 178 mg/kg, i.p.) se mantuvo constante hasta el final del experimento (29%, $p < 0.05$ y 67%; $p < 0.001$; respectivamente, cuando se compara con el grupo control) (Figura 22). Sin embargo, 23 h después de cada tratamiento, ambos grupos mostraron una recuperación de la movilidad alcanzando valores similares a los observados en los animales control (Figura 23).

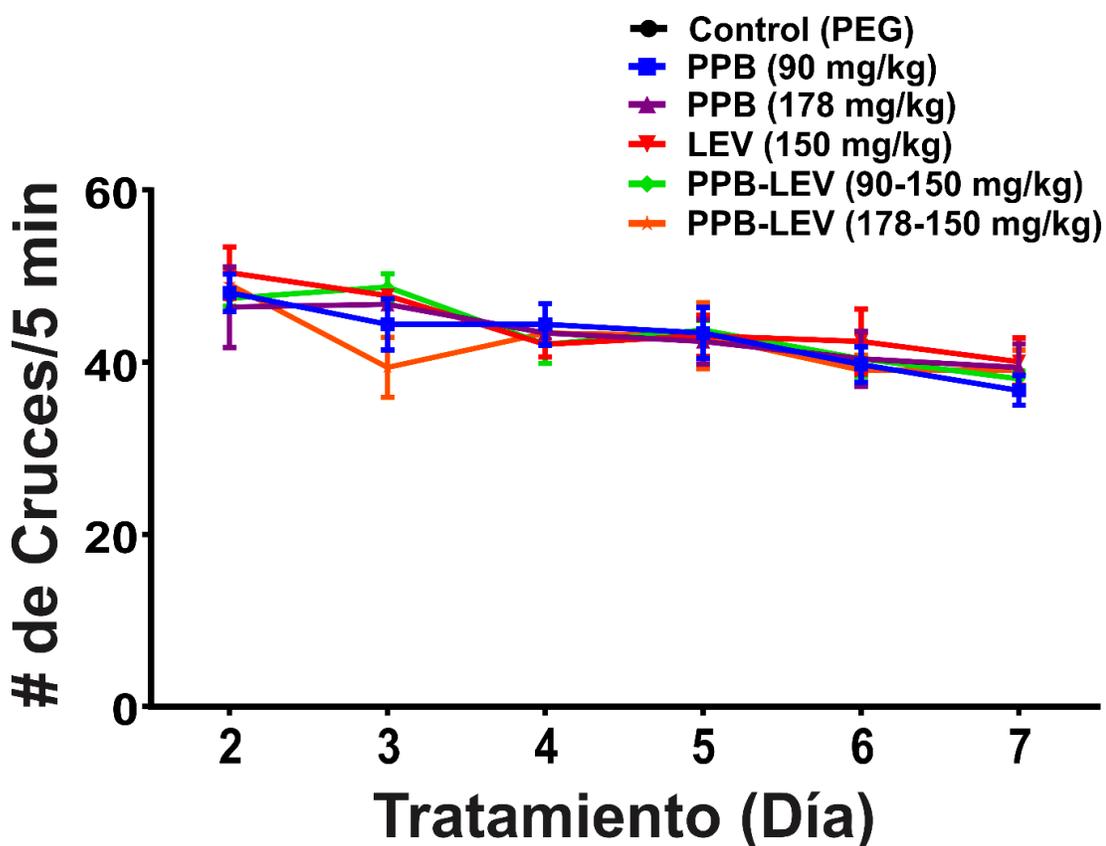


Figura 23. Evaluación de la actividad motora 23 h después de la administración repetida de PPB (90 o 178 mg/kg, i.p.) y su combinación con LEV. Nótese que 23 h después de cada tratamiento, todos los animales recuperaron la actividad motora observándose una actividad valores similares al grupo control. Los valores representan el promedio del número (#) de cruces entre los cuadrantes \pm EE de la media, evaluados durante 5 minutos.

La evaluación histológica del tejido renal mostró que la administración subcrónica de distintas dosis de PPB (90 o 178 mg/kg, i.p.) no indujo cambios estructurales observándose células bien preservadas con características morfológicas similares a las encontradas en los animales control (Figura 24). En cuanto a la evaluación del tejido hepático los animales tratados con PPB (178 mg/kg, i.p.) presentaron infiltrados leucocitarios perivasculares. Estos efectos se asociaron con la presencia de depósitos citoplasmáticos de lípidos (prueba de rojo oleoso) (Figuras 25 y 26).

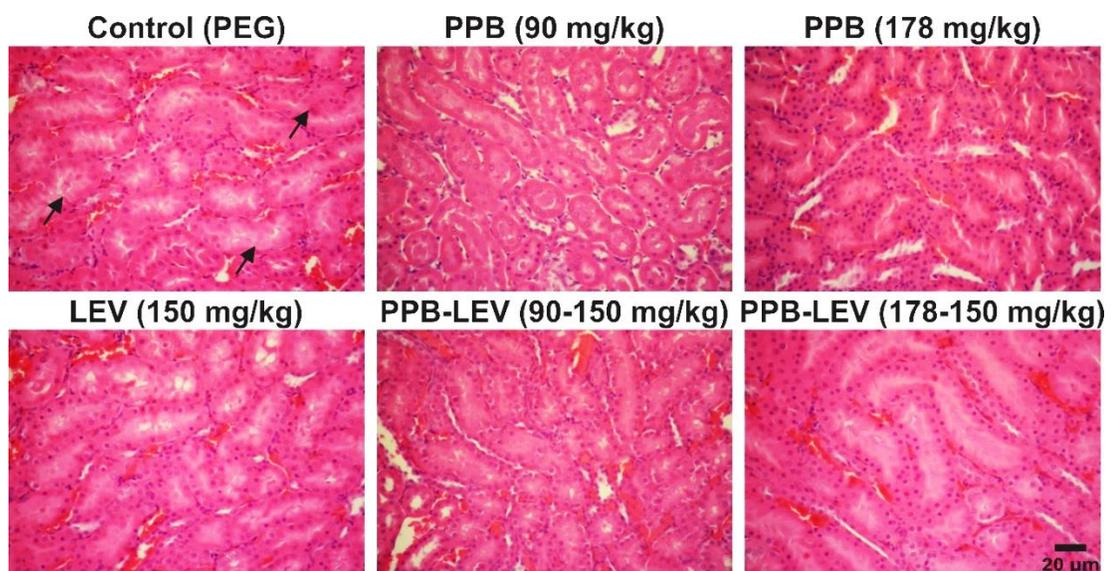


Figura 24. Microfotografías representativas de tejido renal evaluado mediante la tinción de hematoxilina-eosina 6 días después de la administración subcrónica de distintas dosis de PPB y su combinación con LEV. Los cortes histológicos muestran el área de la medula renal compuesta principalmente por túbulos renales cortados longitudinal o transversalmente y que presentan una disposición radial (flechas). En todos los tejidos se observaron características histológicas normales (similares al grupo control) demostrando que la administración subcrónica del PPB y LEV no indujo cambios renales aparentes.

6.3.3.3 Grupo LEV

En los animales tratados con LEV no se observaron cambios en la actividad motora con respecto a los animales del grupo control ($p > 0.05$). Situación que fue persistente 23 h después de cada tratamiento y se mantuvo

hasta el final del experimento (Figuras 22 y 23). En cuanto a la evaluación histológica no se observaron cambios en el tejido renal y hepático con respecto al grupo control (Figuras 24-26).

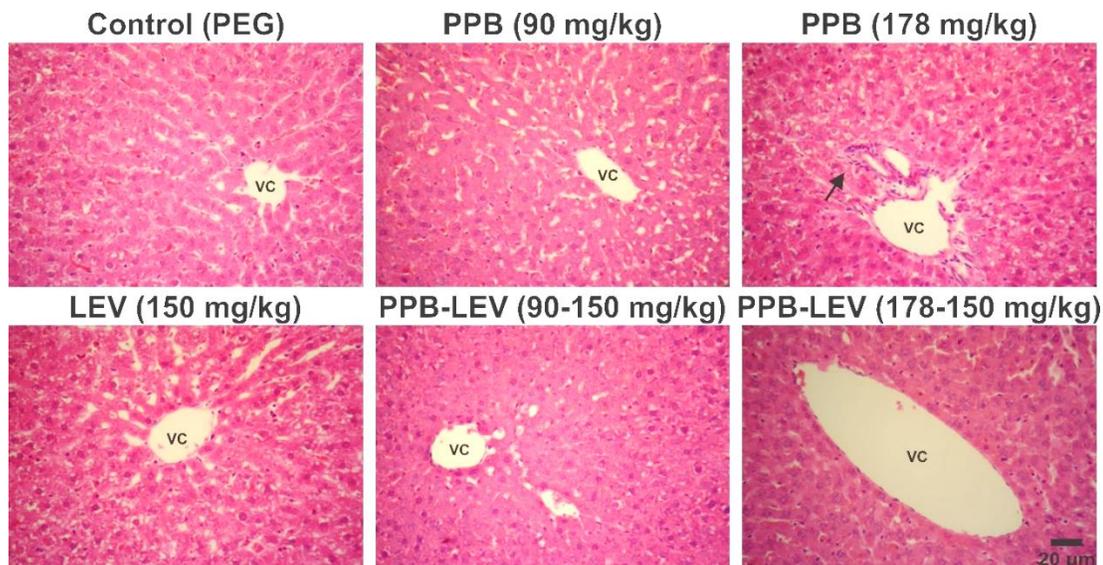


Figura 25. Microfotografías representativas de tejido hepático evaluado mediante la tinción hematoxilina-eosina 6 días después de la administración subcrónica de distintas dosis de PPB y su combinación con LEV. En las imágenes se observa la arquitectura lobulillar clásica de la glándula hepática que tiene forma hexagonal. En el centro del hexágono se encuentra la luz vascular que corresponde a la vena centrolobulillar (VC). En la periferia, formando los ángulos del hexágono, se distinguen espacios triangulares o espacios porta, constituidos por estructuras vasculares y canaliculos biliares sostenidas por un tejido conectivo. Solamente el grupo de animales tratado con PPB (178 mg/kg, i.p.) presentó infiltrados leucocitarios perivasculares (flechas).

6.3.3.4 Grupos PPB-LEV

En los animales tratados con la combinación de PPB y LEV a las distintas dosis (90-150 y 178-150 mg/kg, i.p.) se observó una disminución de la actividad motora a partir de la primera administración con respecto al grupo control (32%, $p < 0.01$ y 35%, $p < 0.001$; respectivamente). Este efecto se mantuvo hasta el final del experimento (28%, $p < 0.05$ y 69%, $p < 0.001$;

respectivamente) (día 6). En ambos grupos la actividad motora se recuperó 23 h después de cada tratamiento (Figuras 22 y 23).

En la evaluación histológica del tejido renal no se observaron cambios con respecto al tejido control. Sin embargo, al igual que el grupo tratado solamente con PPB (178 mg/kg, i.p.), la administración subcrónica de la combinación PPB-LEV (178-150 mg/kg, i.p.) mostró infiltrados leucocitarios alrededor de las arterias hepáticas. La evaluación del tejido con rojo oleoso reveló depósitos intracelulares de lípidos (Figuras 24-26).

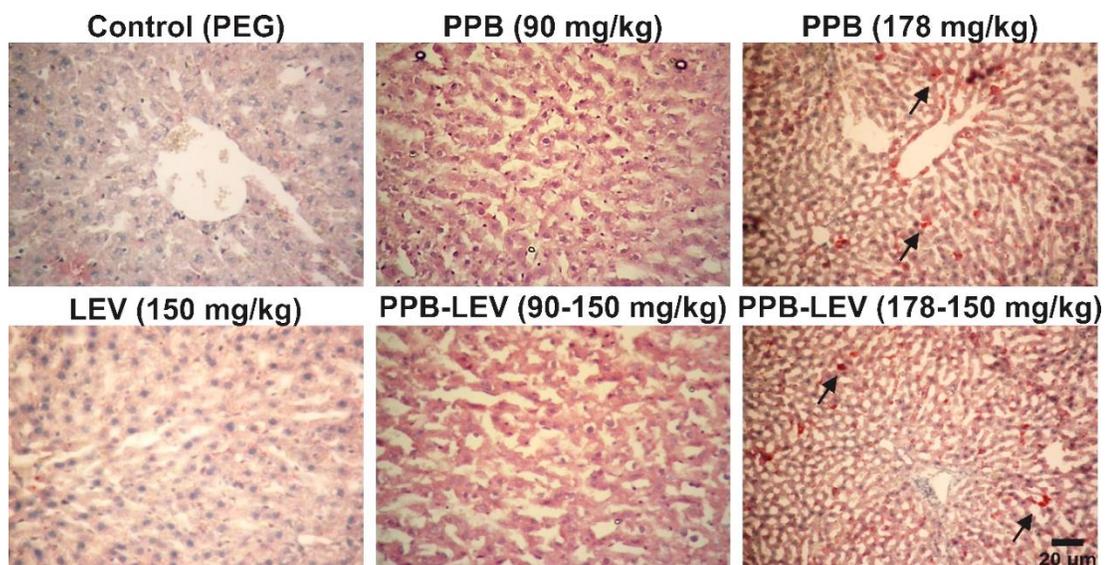


Figura 26. Microfotografías representativas de la tinción de rojo oleoso en el tejido hepático evaluado 6 días después de la administración subcrónica de distintas dosis de PPB y su combinación con LEV. Los tejidos de animales tratados con PPB (178 mg/kg, i.p.) y PPB-LEV (178-150 mg/kg, i.p.) resultaron positivos para la prueba de rojo oleoso, observándose depósitos citoplasmáticos de lípidos (flechas).

6.3.4 Metodología para la evaluación de la recuperación hepática después de la administración subcrónica de PPB

Como se mostró anteriormente la administración subcrónica de PPB induce daño hepático. Sin embargo, considerando la capacidad del hígado para regenerar sus funciones, estos efectos pueden ser revertidos después de

suspender el tratamiento. El presente experimento se diseñó para evaluar la recuperación del tejido hepático 30 días después de la administración subcrónica de PPB.

Protocolo experimental

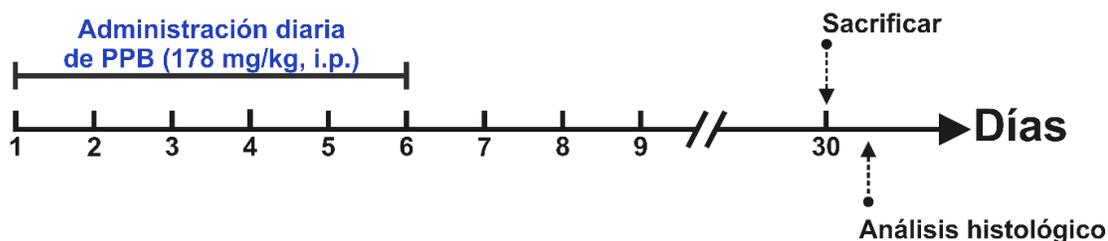


Figura 27. Protocolo experimental para la evaluación del tejido hepático 30 días después de la administración diaria de PPB (178 mg/kg, i.p.).

6.3.4.1 Administración subcrónica de PPB

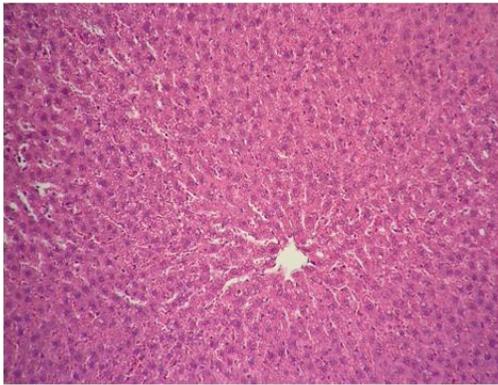
Después del periodo de habituación, se realizó la administración diaria de PPB (178 mg/kg, i.p., por día, $n=4$), la cual se repitió durante 6 días. Posteriormente (30 días después de la primera administración de PPB), los animales se sacrificaron para la evaluación histológica del tejido hepático (tinciones de hematoxilina-eosina y rojo oleoso, ver sección 6.3.1.2) (Figura 27).

6.3.5 Resultados

6.3.5.1 Administración subcrónica de PPB

El 100% de los animales sobrevivió treinta días después de la administración subcrónica de PPB. En cuanto a la evaluación histológica, se observaron tejidos hepáticos bien preservados y sin aparentes depósitos citoplasmáticos de lípidos (Figura 28).

Hematoxilina-Eosina



Rojo Oleoso



Figura 28. Microfotografías representativas de la evaluación histológica del tejido hepático mediante las tinciones de hematoxilina-eosina y rojo oleoso, evaluadas 30 días después del tratamiento subcrónico con PPB (178 mg/kg, i.p.). En general se observaron tejidos bien preservados con características morfológicas similares a las mostradas por los animales control. Sin que se observaran depósitos citoplasmáticos de lípidos (tinción de rojo oleoso).

6.3.6 Discusión

La evaluación histológica del tejido hepático inmediatamente después de la administración subcrónica de PPB (178 mg/kg, i.p.), reveló la presencia de depósitos intracelulares de lípidos (hígado graso), así como infiltrados leucocitarios. Estos efectos desaparecieron 30 días después de la administración repetida de PPB (178 mg/kg/día, i.p., durante 6 días).

La enfermedad del hígado graso (esteatosis hepática) es la forma más común de lesión hepática inducida por el metabolismo de fármacos, la cual se caracteriza por la acumulación anormal de ciertas grasas (principalmente triglicéridos, ácidos grasos, colesterol, éster de colesterol y fosfolípidos) dentro de las células hepáticas, estrés oxidativo y reclutamiento de leucocitos en la vasculatura hepática (Farrell, 2002; Jaeschke, 2011; Jaeschke et al., 2002; Mofrad et al., 2003).

Mediante estudios en cultivos hepáticos se ha descrito que la acumulación de PPB induce disminución de la viabilidad celular hepática (Nakagawa y Moldeus, 1998). Efecto mediado por falla de la función mitocondrial con la consecuente disminución de los niveles de ATP, incremento en la producción de aniones superóxido y el deterioro de los mecanismos antioxidantes en el organismo, conduciendo a la muerte celular por apoptosis (Nakagawa y Moldéus, 1998; Szelag et al., 2016). Efecto similar al observado con el tratamiento subcrónico de FAE como: valproato, midazolam, fenobarbital, amiodarona, felbamato, propranolol y tamoxifeno (Grover et al., 2016; Hamed et al., 2016; Schumacher y Guo, 2015).

En la fase experimental, la administración subcrónica de uno o más FAE induce la exacerbación de los efectos tóxicos, lo que puede resultar en la muerte de los animales (Löscher, 2011). Sin embargo, a diferencia de otros FAE, el LEV tiene poco metabolismo hepático mediado por el sistema enzimático citocromo P450, siendo la vía renal su principal ruta de eliminación (Lyseng-Williamson, 2011; Patsalos, 2004). Esto concuerda con nuestros resultados en donde se observó que el tratamiento subcrónico con LEV no indujo aparentes efectos hepatotóxicos.

Considerando que los efectos tóxicos inducidos por la administración subcrónica de PPB se revirtieron 30 días después del tratamiento, es posible sugerir que estos cambios podrían representar etapas tempranas de hepatotoxicidad causada por la acumulación sistémica de PPB, sin que esta acumulación disminuya la viabilidad celular. En este contexto, en los últimos años se ha sugerido que el tratamiento intermitente con FAE podría suprimir los efectos tóxicos inducidos por tratamientos a largo plazo (Kwan et al., 2001).

En cuanto a los cambios observados en la prueba de campo abierto, Matthews et al. (1956) reportaron que la administración sistémica de PPB

induce una depresión profunda del SNC, expresada con la pérdida del control muscular (ataxia). Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el PPB tiene efectos sedantes, debido a la considerable disminución de la movilidad en la prueba de campo abierto, la cual es recuperada 24 h después de cada tratamiento. Por otra parte, nuestros resultados confirman que el LEV no modifica la actividad motora en la prueba de campo abierto (Gower et al., 1992; Löscher y Hönack, 1993). Además, de que no potenciar los efectos sedantes observados con la administración de PPB. Considerando lo anterior, podríamos sugerir que la combinación PPB-LEV induce efectos tóxicos mínimos y podría representar una estrategia segura para el tratamiento subcrónico de la actividad epiléptica.

7. Conclusiones

De los resultados obtenidos se desprenden las siguientes conclusiones:

- La administración única de PPB durante el *SE* disminuye los incrementos en la liberación de glutamato, daño neuronal y excitabilidad hipocampal, lo cual podría ser de utilidad en la búsqueda de nuevas estrategias para el tratamiento del *status*.
- La administración subcrónica de PPB, tiene efectos parciales en las alteraciones observadas durante el proceso de epileptogénesis inducido por el *SE*.
- La administración subcrónica de PPB-LEV incrementa los efectos anticonvulsivantes de ambos fármacos. Sin embargo, no evita el desarrollo de CRE.
- La administración subcrónica de PPB y su combinación con LEV induce efectos hepatotóxicos, los cuales son revertidos después de la interrupción del tratamiento.

8. Perspectivas

El presente trabajo representa el primer estudio que demuestra el efecto del PPB solo y asociado a un FAE en el desarrollo de la epileptogénesis secundaria al SE. Con base en lo anterior, es necesario continuar con la investigación del PPB, ya que podría representar una alternativa en la búsqueda de nuevas estrategias para el control de las crisis epilépticas. En este sentido, se mencionarán algunas perspectivas que derivan de esta investigación.

- Analizar el efecto de la coadministración de PPB con distintos FAE durante el proceso de epileptogénesis inducido por diferentes modelos animales; con el propósito de encontrar una combinación ideal y segura para evitar el desarrollo de CRE.
- Determinar si la administración de PPB es eficaz para el tratamiento de actividad epileptiforme resistente al tratamiento farmacológico.
- Evaluar el efecto de la liberación sostenida del PPB durante el proceso de epileptogénesis, mediante el uso de microbombas implantadas de manera subcutánea.
- Evaluar el papel del PPB en diversos sistemas neuronales implicados en el control de la actividad epiléptica como la neurotransmisión GABAérgica, dopaminérgica, serotoninérgica, colinérgica y la mediada por opioides.
- Estudiar el efecto de la asociación del PPB con otras estrategias terapéuticas como el uso de estimulación eléctrica transcraneal o estimulación del nervio vago, para el tratamiento de la actividad epiléptica y alteraciones cognitivas asociadas a la epilepsia.

- Evaluar el efecto del PPB en distintos trastornos neurodegenerativos como Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

9. Referencias

- Abend, N.S., Dlugos, D.J., 2008. Treatment of refractory status epilepticus: Literature review and a proposed protocol. *Pediatr. Neurol.* 38, 377–390. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2008.01.001
- Abend, N.S., Monk, H.M., Licht, D.J., Dlugos, D.J., 2009. Intravenous levetiracetam in critically ill children with status epilepticus or acute repetitive seizures. *Pediatr. Crit. Care Med.* 10, 505–10. doi:10.1097/PCC.0b013e3181a0e1cf
- Adem, A., Jolkkonen, M., Bogdanovic, N., Islam, A., Karlsson, E., 1997. Localization of M1 muscarinic receptors in rat brain using selective muscarinic toxin-1. *Brain Res. Bull.* 44, 597–601. doi:10.1016/S0361-9230(97)00281-5
- Aiguabella, M., Falip, M., Villanueva, V., de la Peña, P., Molins, A., Garcia-Morales, I., Saiz, R.A., Pardo, J., Tortosa, D., Sansa, G., Miró, J., 2011. Efficacy of intravenous levetiracetam as an add-on treatment in status epilepticus: A multicentric observational study. *Seizure* 20, 60–64. doi:10.1016/j.seizure.2010.10.009
- Allan, S.M., Tyrrell, P.J., Rothwell, N.J., 2005. Interleukin 1 and neuronal injury. *Immunology* 5, 629–640. doi:10.1038/nri1664
- Alldredge, B.K., Gelb, A.M., Isaacs, S.M., Corry, M.D., Allen, F., Ulrich, S., Gottwald, M.D., O'Neil, N., Neuhaus, J.M., Segal, M.R., Lowenstein, D.H., 2001. A comparison of lorazepam, diazepam, and placebo for the treatment of out-of-hospital status epilepticus. *N. Engl. J. Med.* 345, 631–637. doi:10.1056/NEJMoa002141
- Allen, N.J., Barres, B.A., 2009. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* 457, 675–677. doi:10.1038/457675a
- André, V., Ferrandon, A., Marescaux, C., Nehlig, A., 2001. Vigabatrin protects against hippocampal damage but is not antiepileptogenic in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 47, 99–117. doi:10.1016/S0920-1211(01)00299-6

- Begley, C.E., Durgin, T.L., 2015. The direct cost of epilepsy in the United States: A systematic review of estimates. *Epilepsia* 56, 1376–1387. doi:10.1111/epi.13084
- Behl, C., Skutella, T., Lezoualc'h, F., Post, A., Widmann, M., Newton, C.J., Holsboer, F., 1997. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: Structure-activity relationship. *Mol. Pharmacol.* 51, 535–541. doi:10.1124/mol.51.4.535
- Ben-Ari, Y., 2001. Cell death and synaptic reorganization produced by seizures. *Epilepsia* 42, 5–7.
- Ben-Ari, Y., Dudek, F.E., 2010. Primary and secondary mechanisms of epileptogenesis in the temporal lobe: There is a before and an after. *Epilepsy Curr.* 10, 118–125. doi:10.1111/j.1535-7511.2010.01376.x
- Ben-Ari, Y., Tremblay, E., Riche, D., Ghilini, G., Naquet, R., 1981. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: Metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 6, 1361–1391. doi:10.1016/0306-4522(81)90193-7
- Bertram, E.H., Cornett, J.F., 1994. The evolution of a rat model of chronic spontaneous limbic seizures. *Brain Res.* 661, 157–162. doi:10.1016/0006-8993(94)91192-4
- Blair, R.M., Fang, H., Branham, W.S., Hass, B.S., Dial, S.L., Moland, C.L., Tong, W., Shi, L., Perkins, R., Sheehan, D.M., 2000. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands. *Toxicol. Sci.* 54, 138–153. doi:10.1093/toxsci/54.1.138
- Bland, B.H., 1986. The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog. Neurobiol.* 26, 1–54. doi:10.1016/0301-0082(86)90019-5
- Blümcke, I., Becker, a J., Klein, C., Scheiwe, C., Lie, a a, Beck, H., Waha, A., Friedl, M.G., Kuhn, R., Emson, P., Elger, C., Wiestler, O.D., 2000. Temporal lobe epilepsy associated up-regulation of metabotropic glutamate receptors: Correlated changes in mGluR1 mRNA and protein expression in experimental animals and human patients. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 1–10.

- Blume, W.T., Lüders, H.O., Mizrahi, E., Tassinari, C., Van Emde Boas, W., Engel J., J., 2001. Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: Report of the ILAE task force on classification and terminology. *Epilepsia* 42, 1212–1218. doi:10.1046/j.1528-1157.2001.22001.x
- Borges, K., Gearing, M., McDermott, D.L., Smith, A.B., Almonte, A.G., Wainer, B.H., Dingledine, R., 2003. Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. *Exp. Neurol.* 182, 21–34. doi:10.1016/S0014-4886(03)00086-4
- Bradford, H.F., 1995. Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog. Neurobiol.* 47, 477–511.
- Bragin, A., Engel, J., Wilson, C.L., Fried, I., Mathern, G.W., 1999. Hippocampal and entorhinal cortex high-frequency oscillations (100-500 Hz) in human epileptic brain and in kainic acid-treated rats with chronic seizures. *Epilepsia* 40, 127–137. doi:10.1111/j.1528-1157.1999.tb02065.x
- Bragin, A., Wilson, C.L., Almajano, J., Mody, I., Engel, J., 2004. High-frequency oscillations after status epilepticus: Epileptogenesis and seizure genesis. *Epilepsia* 45, 1017–1023. doi:10.1111/j.0013-9580.2004.17004.x
- Brandt, C., Glien, M., Gastens, A.M., Fedrowitz, M., Bethmann, K., Volk, H.A., Potschka, H., Löscher, W., 2007. Prophylactic treatment with levetiracetam after status epilepticus: Lack of effect on epileptogenesis, neuronal damage, and behavioral alterations in rats. *Neuropharmacology* 53, 207–221. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.05.001
- Brines, M.L., Sundaresan, S., Spencer, D.D., de Lanerolle, N.C., 1997. Quantitative autoradiographic analysis of ionotropic glutamate receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy: Up-regulation in reorganized epileptogenic hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2035–2044.
- Buzsaki, G., 1986. Hippocampal sharp waves: Their origin and significance. *Brain Res.* 398, 242–252. doi:10.1016/0006-8993(86)91483-6
- Buzsaki, G., Horvath, Z., Urioste, R., Wise, K.D., 1992. High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science* (80-.). 256, 1025–1027. doi:10.1126/science.1589772
- Cain, D.P., McKittrick, D.J., Boon, F., 1992. Rapid and reliable induction of partial status epilepticus in naive rats by low-frequency (3-Hz) stimulation of the amygdala. *Epilepsy Res.* 12, 51–55. doi:10.1016/0920-1211(92)90091-7

- Calabresi, P., Cupini, L.M., Centonze, D., Pisani, F., Bernardi, G., 2003. Antiepileptic drugs as a possible neuroprotective strategy in brain ischemia. *Ann. Neurol.* 53, 693–702. doi:10.1002/ana.10603
- Cashman, A.L., Warshaw, E.M., 2005. Parabens: A review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties. *Dermat. contact, atopic, Occup. drug* 16, 57–66.
- Chen, J., Ahn, K.C., Gee, N. a., Gee, S.J., Hammock, B.D., Lasley, B.L., 2007. Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 221, 278–284. doi:10.1016/j.taap.2007.03.015
- Chihorek, A.M., Abou-Khalil, B., Malow, B.A., 2007. Obstructive sleep apnea is associated with seizure occurrence in older adults with epilepsy. *Neurology* 69, 1823–1827. doi:10.1212/01.wnl.0000279334.78298.d5
- Choi, D.W., 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 7, 369–379.
- Chopp, M., Li, Y., Zhang, J., 2008. Plasticity and remodeling of brain. *J. Neurol. Sci.* 265, 97–101. doi:10.1016/j.jns.2007.06.013
- Chrobak, J.J., Buzsaki, G., 1996. High-frequency oscillations in the output networks of the hippocampal-entorhinal axis of the freely behaving rat. *J. Neurosci.* 16, 3056–3066.
- Clifford, D.B., Olney, J.W., Maniotis, a, Collins, R.C., Zorumski, C.F., 1987. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 23, 953–968. doi:10.1016/0306-4522(87)90171-0
- Coeytaux, A., Jallon, P., Galobardes, B., Morabia, A., 2000. Incidence of status epilepticus in French-speaking Switzerland: (EPISTAR). *Neurology* 55, 693–697. doi:10.1212/WNL.55.5.693
- Cohen, A.S., Lin, D.D., Quirk, G.L., Coulter, D.A., 2003. Dentate granule cell GABA A receptors in epileptic hippocampus: Enhanced synaptic efficacy and altered pharmacology. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1607–1616. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02597.x
- Coulter, D.A., Steinhäuser, C., 2015. Role of astrocytes in epilepsy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 15, 1–12. doi:10.1007/978-0-387-79492-1

- Covolan, L., Mello, L.E., 2006. Assessment of the progressive nature of cell damage in the pilocarpine model of epilepsy. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 915–24.
- Csicsvari, J., Hirase, H., Czurkó, a, Mamiya, a, Buzsáki, G., 1999. Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving Rat. *J. Neurosci.* 19, 274–287.
- Cunha, A.O.S., Mortari, M.R., Liberato, J.L., Dos Santos, W.F., 2009. Neuroprotective effects of diazepam, carbamazepine, phenytoin and ketamine after pilocarpine-induced status epilepticus. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 104, 470–477. doi:10.1111/j.1742-7843.2009.00403.x
- Darbre, P.D., Harvey, P.W., 2014. Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: A review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status. *J. Appl. Toxicol.* 34, 925–938. doi:10.1002/jat.3027
- Deckers, C.L., Czuczwar, S.J., Hekster, Y.A., Keyser, A., Kubova, H., Meinardi, H., Patsalos, P.N., Renier, W.O., Van Rijn, C.M., 2000. Selection of antiepileptic drug polytherapy based on mechanisms of action: The evidence reviewed. *Epilepsia* 41, 1364–1374. doi:10.1111/j.1528-1157.2000.tb00111.x
- DeLorenzo, R.J., Hauser, W.A., Towne, A.R., Boggs, J.G., Pellock, J.M., Penberthy, L., Garnett, L., Fortner, C.A., Ko, D., 1996. A prospective, population-based epidemiologic study of status epilepticus in Richmond, Virginia. *Neurology* 46, 1029–1035. doi:10.1212/WNL.46.4.1029
- Devinsky, O., 2003. Psychiatric comorbidity in patients with epilepsy: Implications for diagnosis and treatment. *Epilepsy Behav.* 4, 2–10. doi:10.1016/j.yebeh.2003.10.002
- Dubal, D.B., Kashon, M.L., Pettigrew, L.C., Ren, J.M., Finklestein, S.P., Rau, S.W., Wise, P.M., 1998. Estradiol protects against ischemic injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 1253–1258. doi:10.1097/00004647-199811000-00012
- Dubé, C., Boyet, S., Marescaux, C., Nehlig, A., 2001. Relationship between neuronal loss and interictal glucose metabolism during the chronic phase of the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult rat. *Exp. Neurol.* 167, 227–241. doi:10.1006/exnr.2000.7561

- Dudek, F.E., Clark, S., Williams, P.A., Grabenstatter, H.L., 2006. Kainate-induced status epilepticus: A chronic model of acquired epilepsy, en: Pitkänen, A., Schwartzkroin, S.L., Moshe, S.L. (Eds.), *Models of seizures and epilepsy*. pp. 415–432.
- Eid, T., Thomas, M.J., Spencer, D.D., Rundén-Pran, E., Lai, J.C.K., Malthankar, G. V., Kim, J.H., Danbolt, N.C., Ottersen, O.P., De Lanerolle, N.C., 2004. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: Possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet* 363, 28–37. doi:10.1016/S0140-6736(03)15166-5
- EMC, 1999. *Electronic medicines compendium UK* [WWW Document]. URL <https://www.medicines.org.uk/emc/> (consultado 1.25.17).
- Engel, J., 2001. ILAE Commission report a proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: Report of the ILAE task force on classification and terminology. *Epilepsia* 42, 796–803. doi:10.1046/j.1528-1157.2001.10401.x
- Engel, J., 1996. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 26, 141–150. doi:10.1016/S0920-1211(96)00043-5
- Engel, J., Pedley, T.A., 1997. Introduction: What is epilepsy?, en: Engel, J., Pedley, T.A. (Eds.), *Epilepsy a comprehensive textbook*. Philadelphia, pp. 1–7.
- Engel, J., Wolfson, L., Brown, L., 1978. Anatomical correlates of electrical and behavioral events related to amygdaloid kindling. *Ann. Neurol.* 3, 538–544. doi:10.1002/ana.410030615
- Farrell, G.C., 2002. Drugs and steatohepatitis. *Semin. Liver Dis.* 22, 185–194. doi:10.1055/s-2002-30106
- Faulkner, H.J., Traub, R.D., Whittington, M.A., 1998. Disruption of synchronous gamma oscillations in the rat hippocampal slice: A common mechanism of anaesthetic drug action. *Br. J. Pharmacol.* 125, 483–492. doi:10.1038/sj.bjp.0702113
- Fernández-Mas, R., Valdés-Cruz, A., Martínez, A., Magdaleno-Madrigal, V.M., Almazán-Alvarado, S., Martínez-Vargas, D., Fernández-Guardiola, A., 1998. Visualización gráfica de las transiciones de las fases del sueño en el hombre: Métodos de representación tridimensional. *Salud Ment.* 21, 27–32.

- Fisher, R.S., Boas, W.V.E., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J., 2005. Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46, 470–472.
- Forsgren, L., Nyström, L., 1990. An incident case-referent study of epileptic seizures in adults. *Epilepsy Res.* 6, 66–81. doi:10.1016/0896-6974(94)90006-X
- François, J., Germe, K., Ferrandon, A., Koning, E., Nehlig, A., 2011. Carisbamate has powerful disease-modifying effects in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neuropharmacology* 61, 313–328. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.04.018
- François, J., Koning, E., Ferrandon, A., Nehlig, A., 2006. The combination of topiramate and diazepam is partially neuroprotective in the hippocampus but not antiepileptogenic in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 72, 147–163. doi:10.1016/j.epilepsyres.2006.07.014
- Freese, E., Sheu, C.W., Galliers, E., 1973. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature* 241, 321–325. doi:10.1038/241321a0
- Fujikawa, D.G., 1996. The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res.* 725, 11–22.
- Fujikawa, D.G., 1995. Neuroprotective effect of ketamine administered after status epilepticus onset. *Epilepsia* 36, 186–195. doi:10.1111/j.1528-1157.1995.tb00979.x
- Fujikawa, D.G., Shinmei, S.S., Cai, B., 1999. Lithium-pilocarpine-induced status epilepticus produces necrotic neurons with internucleosomal DNA fragmentation in adult rats. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1605–14.
- García-Domenech, R., Gálvez, J., Julián-Ortiz, J. V, Pogliani, L., 2008. Some new trends in chemical graph theory. *Chem. Rev.* 108, 1127–1169. doi:10.1021/cr0780006
- Geddes, J.W., Cahan, L.D., Cooper, S.M., Kim, R.C., Choi, B.H., Cotman, C.W., 1990. Altered distribution of excitatory amino acid receptors in temporal lobe epilepsy. *Exp. Neurol.* 108, 214–220. doi:10.1016/0014-4886(90)90125-C
- Glien, M., Brandt, C., Potschka, H., Löscher, W., 2002. Effects of the novel

antiepileptic drug levetiracetam on spontaneous recurrent seizures in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 43, 350–357. doi:10.1046/j.1528-1157.2002.18101.x

Gorter, J.A., Gonc, P.M., Vliet, E. a Van, Aronica, E., Lopes, F.H., Lucassen, P.J., 2003. Neuronal cell death in a rat model for mesial temporal lobe epilepsy is induced by the initial status epilepticus and not by later repeated spontaneous seizures reports cell loss in septum 44, 647–658. doi:10.1046/j.1528-1157.2003.53902.x

Gower, a. J., Noyer, M., Verloes, R., Gobert, J., Wulfert, E., 1992. UCB L059, a novel anti-convulsant drug: Pharmacological profile in animals. *Eur. J. Pharmacol.* 222, 193–203. doi:10.1016/0014-2999(92)90855-X

Grover, E.H., Nazzal, Y., Hirsch, L.J., 2016. Treatment of convulsive status epilepticus. *Curr. Treat. Options Neurol.* 18, 1–20. doi:10.1007/s11940-016-0394-5

Hagihira, S., 2015. Changes in the electroencephalogram during anaesthesia and their physiological basis. *Br. J. Anaesth.* 115, i27–i31. doi:10.1093/bja/aev212

Hailer, N.P., 2008. Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: It is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells. *Prog. Neurobiol.* 84, 211–233. doi:10.1016/j.pneurobio.2007.12.001

Hailer, N.P., Grampp, A., Nitsch, R., 1999. Proliferation of microglia and astrocytes in the dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: A quantitative bromodeoxyuridine-labelling study. *Eur. J. Neurosci.* 11, 3359–3364. doi:10.1046/j.1460-9568.1999.00808.x

Hamed, S., Fathy, R., Radwan, M., Abdellah, M., 2016. Fatty liver in adults receiving antiepileptic medications: Relationship to the metabolic risks. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 2433, 1–8. doi:10.1586/17512433.2016.1131123

Hellsten, J., West, M.J., Arvidsson, A., Ekstrand, J., Jansson, L., Wennström, M., Tingström, A., 2005. Electroconvulsive seizures induce angiogenesis in adult rat hippocampus. *Biol. Psychiatry* 58, 871–878. doi:10.1016/j.biopsych.2005.05.023

Hermann, B., Seidenberg, M., Lee, E.J., Chan, F., Rutecki, P., 2007. Cognitive phenotypes in temporal lobe epilepsy. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 13, 12–20. doi:10.1017/S135561770707004X

- Hesdorffer, D.C., Logroscino, G., Cascino, G., Annegers, J.F., Hauser, W.A., 1998a. Incidence of status epilepticus in Rochester, Minnesota, 1965-1984. *Neurology* 50, 735–741. doi:10.1212/WNL.50.3.735
- Hesdorffer, D.C., Logroscino, G., Cascino, G., Annegers, J.F., Hauser, W.A., 1998b. Risk of unprovoked seizure after acute symptomatic seizure: Effect of status epilepticus. *Ann. Neurol.* 44, 908–912. doi:10.1002/ana.410440609
- Holtkamp, M., 2011. Treatment strategies for refractory status epilepticus. *Curr. Opin. Crit. Care* 17, 94–100. doi:10.1097/MCC.0b013e328342fab5
- Holtkamp, M., Othman, J., Buchheim, K., Meierkord, H., 2005. Predictors and prognosis of refractory status epilepticus treated in a neurological intensive care unit. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 76, 534–539. doi:10.1136/jnnp.2004.041947
- Honchar, M.P., Olney, J.W., Sherman, W.R., 1983. Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. *Science* 220, 323–325. doi:10.1126/science.6301005
- Hosford, D. a, Crain, B.J., Cao, Z., Bonhaus, D.W., Friedman, a H., Okazaki, M.M., Nadler, J. V, McNamara, J.O., 1991. Increased AMPA-sensitive quisqualate receptor binding and reduced NMDA receptor binding in epileptic human hippocampus. *J. Neurosci.* 11, 428–434.
- Iadarola, M., Gale, K., 1982. Substantia nigra: Site of anticonvulsant activity mediated by gamma-aminobutyric acid. *Science* (80-). 3–6.
- İşgüder, R., Güzel, O., Ceylan, G., Yılmaz, Ü., Ağın, H., 2016. A Comparison of intravenous levetiracetam and valproate for the treatment of refractory status epilepticus in children. *J. Child Neurol.* 0883073816641187-. doi:10.1177/0883073816641187
- Isokawa, M., Mello, L.E.A.M., 1991. NMDA receptor-mediated excitability in dendritically deformed dentate granule cells in pilocarpine-treated rats. *Neurosci. Lett.* 129, 69–73. doi:10.1016/0304-3940(91)90722-6
- Itoh, K., Inamine, M., Oshima, W., Kotani, M., Chiba, Y., Ueno, M., Ishihara, Y., 2015. Prevention of status epilepticus-induced brain edema and neuronal cell loss by repeated treatment with high-dose levetiracetam. *Brain Res.* 1608, 225–234. doi:10.1016/j.brainres.2015.03.005
- Jaeschke, H., 2011. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver

- injury: Present concepts. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26, 173–179. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06592.x
- Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D., Lemasters, J.J., 2002. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 65, 166–176. doi:10.1093/toxsci/65.2.166
- Ji, X., Xu, Z., Criswell, H.E., Boysen, P.G., 2004. Propyl paraben inhibits voltage-dependent sodium channels and protects cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury. *Life Sci.* 74, 3043–3052. doi:10.1016/j.lfs.2003.11.007
- Jonker, D.M., Voskuyl, R.A., Danhof, M., 2007. Synergistic combinations of anticonvulsant agents: What is the evidence from animal experiments? *Epilepsia* 48, 412–434. doi:10.1111/j.1528-1167.2006.00952.x
- Jope, R.S., Morrisett, R.A., Snead, O.C., 1986. Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Exp. Neurol.* 91, 471–480. doi:10.1016/0014-4886(86)90045-2
- Jørgensen, M.B., Finsen, B.R., Jensen, M.B., Castellano, B., Diemer, N.H., Zimmer, J., 1993. Microglial and astroglial reactions to ischemic and kainic acid-induced lesions of the adult rat hippocampus. *Exp Neurol.* doi:10.1006/exnr.1993.1041
- Kaminski, R.M., Matagne, A., Patsalos, P.N., Klitgaard, H., 2009. Benefit of combination therapy in epilepsy: A review of the preclinical evidence with levetiracetam. *Epilepsia* 50, 387–397. doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01713.x
- Kamphuis, W., Rijk, T.C. De, Silva, F.H.L., 1995. Expression of GABA A receptor subunit mRNAs in hippocampal pyramidal and granular neurons in the kindling model of epileptogenesis: An in situ hybridization study. *Mol. Brain Res.* 31, 33–47. doi:10.1016/0169-328X(95)00022-K
- Karunakaran, S., Grasse, D.W., Moxon, K. a., 2012. Changes in network dynamics during status epilepticus. *Exp. Neurol.* 234, 454–465. doi:10.1016/j.expneurol.2012.01.020
- Kendrick, K.M., Keverne, E.B., Chapman, C., Baldwin, B.A., 1988. Microdialysis measurement of oxytocin, aspartate, gamma-aminobutyric acid and glutamate release from the olfactory bulb of the sheep during vaginocervical stimulation. *Brain Res.* 442, 171–174.

- Klitgaard, H., Matagne, A., Gobert, J., Wülfert, E., 1998. Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy. *Eur. J. Pharmacol.* 353, 191–206. doi:10.1016/S0014-2999(98)00410-5
- Knake, S., Rosenow, F., Vescovi, M., Oertel, W.H., Mueller, H., Wirbatz, A., Katsarou, N., Hamer, H.M., 2001. Incidence of status epilepticus in adults in Germany: A prospective, population-based study 42, 714–718.
- Kreutzberg, G.W., 1996. Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19, 312–318. doi:10.1016/0166-2236(96)10049-7
- Krook-Magnuson, E., Armstrong, C., Bui, A., Lew, S., Oijala, M., Soltesz, I., 2015. In vivo evaluation of the dentate gate theory in epilepsy 10, 2379–2388. doi:10.1113/JP270056
- Kuhar, M.J., Yamamura, H.I., 1976. Localization of cholinergic muscarinic receptors in rat brain by light microscopic radioautography. *Brain Res.* 110, 229–243. doi:10.1016/0006-8993(76)90399-1
- Kwan, P., Sills, G.J., Brodie, M.J., 2001. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. *Pharmacol. Ther.* 90, 21–34.
- La Grutta, V., Sabatino, M., 1988. Focal hippocampal epilepsy: Effect of caudate stimulation. *Exp. Neurol.* 99, 38–49.
- LaFrance, W.C., Kanner, A.M., Hermann, B., 2008. Psychiatric comorbidities in epilepsy. *Int. Rev. Neurobiol.* 83, 347–383. doi:10.1016/S0074-7742(08)00020-2
- Lara-Valderrábano, L., Rocha, L., Galván, E.J., 2016. Propylparaben reduces the excitability of hippocampal neurons by blocking sodium channels. *Neurotoxicology* 57, 183–193. doi:10.1016/j.neuro.2016.09.019
- Laroche, S.M., Helmers, S.L., 2004. The new antiepileptic drugs 291, 605–614.
- Lee, D.S., Ryu, H.J., Kim, J.E., Choi, H.C., Kim, Y.I., Song, H.K., Kang, T.C., 2013. The effect of levetiracetam on status epilepticus-induced neuronal death in the rat hippocampus. *Seizure* 22, 368–377. doi:10.1016/j.seizure.2013.02.005
- Lemini, C., Hernández, a, Jaimez, R., Franco, Y., Avila, M.E., Castell, a, 2004. Morphometric analysis of mice uteri treated with the preservatives methyl, ethyl, propyl, and butylparaben. *Toxicol. Ind. Health* 20, 123–132. doi:10.1191/0748233704th202oa

- Lévesque, M., Behr, C., Avoli, M., 2015. The anti-ictogenic effects of levetiracetam are mirrored by interictal spiking and high-frequency oscillation changes in a model of temporal lobe epilepsy. *Seizure* 25, 18–25. doi:10.1016/j.seizure.2014.11.008
- Lévesque, M., Bortel, A., Gotman, J., Avoli, M., 2011. High-frequency (80–500 Hz) oscillations and epileptogenesis in temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 42, 231–241. doi:10.1016/j.nbd.2011.01.007
- Li, X., Breteler, M.M.B., De Bruyne, M.C., Meinardi, H., Hauser, W.A., Hofman, A., 1997. Vascular determinants of epilepsy: The Rotterdam study. *Epilepsia* 38, 1216–1220. doi:10.1111/j.1528-1157.1997.tb01219.x
- Löscher, W., 2015. Single versus combinatorial therapies in status epilepticus: Novel data from preclinical models. *Epilepsy Behav.* 49, 20–25. doi:10.1016/j.yebeh.2015.02.027
- Löscher, W., 2011. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 20, 359–368. doi:10.1016/j.seizure.2011.01.003
- Löscher, W., Brandt, C., 2010. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: Experimental approaches and translational research. *Pharmacol. Rev.* 62, 668–700. doi:10.1124/pr.110.003046.668
- Löscher, W., Hönack, D., 1994. Over-additive anticonvulsant effect of memantine and NBQX in kindled rats. *Eur. J. Pharmacol.* 259, 5–7. doi:10.1016/0014-2999(94)90514-2
- Löscher, W., Hönack, D., 1993. Profile of ucb L059, a novel anticonvulsant drug, in models of partial and generalized epilepsy in mice and rats. *Eur. J. Pharmacol.* 232, 147–158. doi:10.1016/0014-2999(93)90768-D
- Löscher, W., Hönack, D., Rundfeldt, C., 1998. Antiepileptogenic effects of the novel anticonvulsant levetiracetam (ucb L059) in the kindling model of temporal lobe epilepsy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 474–479.
- Löscher, W., Klitgaard, H., Twyman, R.E., Schmidt, D., 2013. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 12, 757–776. doi:10.1038/nrd4126
- Lothman, E.W., Bertram, E.H., Bekenstein, J.W., Perlin, J.B., 1989. Self-sustaining limbic status epilepticus induced by “continuous” hippocampal stimulation: electrographic and behavioral characteristics. *Epilepsy Res.*

3, 107–119. doi:10.1016/0920-1211(89)90038-7

- Lothman, E.W., Bertram, E.H., Kapur, J., Stringer, J.L., 1990. Recurrent spontaneous hippocampal seizures in the rat as a chronic sequela to limbic status epilepticus. *Epilepsy Res.* 6, 110–118. doi:10.1016/0920-1211(90)90085-A
- Lothman, E.W., Bertram, E.H., Stringer, J.L., 1991. Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog. Neurobiol.* 37, 1–82. doi:10.1016/0301-0082(91)90011-O
- Lothman, E.W., Collins, R.C., 1981. Kainic acid induced limbic seizures: Metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. *Brain Res.* 218, 299–318. doi:10.1016/0006-8993(81)91308-1
- Luna, L.G., 1968. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology.* New York.
- Luo, Y., Hu, Q., Zhang, Q., Hong, S., Tang, X., Cheng, L., Jiang, L., 2015. Alterations in hippocampal myelin and oligodendrocyte precursor cells during epileptogenesis. *Brain Res.* 1627, 154–164. doi:10.1016/j.brainres.2015.09.027
- Lynch, B.A., Lambeng, N., Nocka, K., Kensel-hammes, P., Bajjalieh, S.M., Matagne, A., Fuks, B., 2004. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam 101, 9861–9866.
- Lyseng-Williamson, K. a, 2011. Levetiracetam: A review of its use in epilepsy. *Drugs* 71, 489–514. doi:10.2165/11204490-000000000-00000
- Ma, Y., Marquis, R.E., 1996. Irreversible paraben inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. *Lett Appl Microbiol* 23, 329–333.
- Madeja, M., Margineanu, D.G., Gorji, A., Siep, E., Boerrigter, P., Klitgaard, H., Speckmann, E.J., 2003. Reduction of voltage-operated potassium currents by levetiracetam: A novel antiepileptic mechanism of action? *Neuropharmacology* 45, 661–671. doi:10.1016/S0028-3908(03)00248-X
- Maidment, N.T., Brumbaugh, D.R., Rudolph, V.D., Erdelyi, E., Evans, C.J., 1989. Microdialysis of extracellular endogenous opioid peptides from rat brain in vivo. *Neuroscience* 33, 549–57.
- Malmgren, K., Thom, M., 2012. Hippocampal sclerosis-origins and imaging. *Epilepsia* 53, 19–33. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03610.x

- Malow, B., MD, M.S., Foldvary-Schaefer, N., Vaughn, B., Selwa, L., Chervin, R., MD, M.S., Weatherwax, K., Wang, L., Song, Y., 2008. Treating obstructive sleep apnea in adults with epilepsy SYMBOL: A randomized pilot trial. *Neurology* 71, 572–577.
- Manno, E.M., 2003. New management strategies in the treatment of status epilepticus. *Mayo Clin. Proc.* 78, 508–518. doi:10.4065/78.4.508
- Margineanu, D.-G., Matagne, A., Kaminski, R.M., Klitgaard, H., 2008. Effects of chronic treatment with levetiracetam on hippocampal field responses. *Brain Res. Bull.* 77, 282–285.
- Mathern, G.W., Babb, T.L., Leite, J.P., Pretorius, J.K., Yeoman, K.M., Kuhlman, P.A., 1996. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res.* 26, 151–161. doi:10.1016/S0920-1211(96)00052-6
- Mathern, G.W., Pretorius, J.K., Kornblum, H.I., Mendoza, D., Lozada, A., Leite, J.P., Chimelli, L.M., Fried, I., Sakamoto, a C., Assirati, J. a, Lévesque, M.F., Adelson, P.D., Peacock, W.J., 1997. Human hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. *Brain* 120 (Pt 1, 1937–1959.
- Matsuura, M., Oana, Y., Kato, M., Kawana, A., Kan, R., Kubota, H., Nakano, T., Hara, T., Horikawa, N., 2003. A multicenter study on the prevalence of psychiatric disorders among new referrals for epilepsy in Japan. *Epilepsia* 44, 107–114. doi:10.1046/j.1528-1157.2003.25202.x
- Matthews, C., Davidson, J., Bauer, E., Morrison, J.L., Richardson, A.P., 1956. P-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives. II. Acute and chronic toxicity in dogs, rats, and mice. *J. Am. Pharm. Assoc. Am. Pharm. Assoc. (Baltim).* 45, 260–267.
- Mazarati, A.M., Baldwin, R.A., Sankar, R., Wasterlain, C.G., 1998. Time-dependent decrease in the effectiveness of antiepileptic drugs during the course of self-sustaining status epilepticus. *Brain Res.* 814, 179–185. doi:10.1016/S0006-8993(98)01080-4
- Mazarati, A.M., Baldwin, R., Klitgaard, H., Matagne, A., Wasterlain, C.G., 2004. Anticonvulsant effects of levetiracetam and levetiracetam-diazepam combinations in experimental status epilepticus. *Epilepsy Res.* 58, 167–174. doi:10.1016/j.eplepsyres.2004.02.002
- Mazarati, A.M., Wasterlain, C.G., 1999. N-Methyl-D-aspartate receptor

antagonists abolish the maintenance phase of self-sustaining status epilepticus in rat. *Neurosci. Lett.* 265, 187–190. doi:10.1016/S0304-3940(99)00238-4

McNamara, J.O., 1999. Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature* 399, A15-22.

Megiddo, I., Colson, A., Chisholm, D., Dua, T., Nandi, A., Laxminarayan, R., 2016. Health and economic benefits of public financing of epilepsy treatment in India: An agent-based simulation model. *Epilepsia* 57, 464–474. doi:10.1111/epi.13294

Mermelstein, P.G., Becker, J.B., Surmeier, James, D., 1996. Estradiol neurons reduces calcium currents via a membrane receptor. *J. Neurosci.* 16, 595–604.

Mikkonen, M., Soininen, H., Kälviänen, R., Tapiola, T., Ylinen, A., Vapalahti, M., Paljärvi, L., Pitkänen, A., 1998. Remodeling of neuronal circuitries in human temporal lobe epilepsy: Increased expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in the hippocampus and the entorhinal cortex. *Ann. Neurol.* 44, 923–34. doi:10.1002/ana.410440611

Milgram, N.W., Green, I., Liberman, M., Riexinger, K., Petit, T.L., 1985. Establishment of status epilepticus by limbic system stimulation in previously unstimulated rats. *Exp. Neurol.* 88, 253–264. doi:10.1016/0014-4886(85)90189-X

Millan, M.H., Chapman, a. G., Meldrum, B.S., 1993. Extracellular amino acid levels in hippocampus during pilocarpine-induced seizures. *Epilepsy Res.* 14, 139–148. doi:10.1016/0920-1211(93)90018-3

Miller, J.W., McKeon, A.C., Ferrendelli, J.A., 1987. Functional anatomy of pentylentetrazol and electroshock seizures in the rat brainstem. *Ann. Neurol.* 22, 615–621. doi:10.1002/ana.410220510

Miller, J.W., Turner, G.M., Gray, B.C., 1994. Anticonvulsant effects of the experimental induction of hippocampal theta activity. *Epilepsy Res.* 18, 195–204.

Miller, L.P., Johnson, a. E., Gelhard, R.E., Insel, T.R., 1990. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in the rat forebrain—II. Kainic acid receptors. *Neuroscience* 35, 45–51. doi:10.1016/0306-4522(90)90118-N

Miwa, T., Furukawa, S., Nakajima, K., Furukawa, Y., Kohsaka, S., 1997.

Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia. *J. Neurosci. Res.* 50, 1023–1029. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19971215)50:6<1023::AID-JNR13>3.0.CO;2-5

Mofrad, P., Contos, M.J., Haque, M., Sargeant, C., Fisher, R.A., Luketic, V.A., Sterling, R.K., Shiffman, M.L., Stravitz, R.T., Sanyal, A.J., 2003. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* 37, 1286–1292. doi:10.1053/jhep.2003.50229

Nadler, J.V., Perry, B.W., Cotman, C.W., 1978. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature*. doi:10.1038/271676a0

Nagarkatti, N., Deshpande, L.S., DeLorenzo, R.J., 2008. Levetiracetam inhibits both ryanodine and IP3 receptor activated calcium induced calcium release in hippocampal neurons in culture. *Neurosci. Lett.* 436, 289–293. doi:10.1016/j.neulet.2008.02.076

Nakagawa, Y., Moldéus, P., 1998. Mechanism of p-hydroxybenzoate ester-induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 55, 1907–1914. doi:10.1016/S0006-2952(98)00097-5

Nathan, C., 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6, 3051–3064. doi:10.1016/B978-012370420-7/50013-7

Naylor, D.E., Liu, H., Niquet, J., Wasterlain, C.G., 2013. Neurobiology of disease rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* 54, 225–238. doi:10.1016/j.nbd.2012.12.015

Naylor, D.E., Liu, H., Wasterlain, C.G., 2005. Trafficking of GABA(A) receptors, loss of inhibition, and a mechanism for pharmacoresistance in status epilepticus. *J. Neurosci.* 25, 7724–7733. doi:10.1523/JNEUROSCI.4944-04.2005

Neligan, a., Shorvon, S.D., 2011. Prognostic factors, morbidity and mortality in tonic-clonic status epilepticus: A review. *Epilepsy Res.* 93, 1–10. doi:10.1016/j.epilepsyres.2010.09.003

Nguyen, T., Clare, B., Guo, W., Martinac, B., 2005. The effects of parabens on the mechanosensitive channels of *E. coli*. *Eur. Biophys. J.* 34, 389–395.

doi:10.1007/s00249-005-0468-x

- Niespodziany, I., Klitgaard, H., Margineanu, D.G., 2001. Levetiracetam inhibits the high-voltage-activated Ca²⁺ current in pyramidal neurones of rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 306, 5–8. doi:10.1016/S0304-3940(01)01884-5
- Nissinen, J., Halonen, T., Koivisto, E., Pitkänen, a, 2000. A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat. *Epilepsy Res.* 38, 177–205. doi:10.1016/S0920-1211(99)00088-1
- Nissinen, J., Lukasiuk, K., Pitkänen, A., 2001. Is mossy fiber sprouting present at the time of the first spontaneous seizures in rat experimental temporal lobe epilepsy? *Hippocampus* 11, 299–310. doi:10.1002/hipo.1044
- Okubo, T., Yokoyama, Y., Kano, K., Kano, I., 2001. ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER α and PR. *Food Chem. Toxicol.* 39, 1225–1232. doi:10.1016/S0278-6915(01)00073-4
- Oliveira, A.A., Nogueira, C.R.A., Nascimento, V.S., Aguiar, L.M. V, Freitas, R.M., Sousa, F.C.F., Viana, G.S.B., Fonteles, M.M.F., 2005. Evaluation of levetiracetam effects on pilocarpine-induced seizures: Cholinergic muscarinic system involvement. *Neurosci. Lett.* 385, 184–188. doi:10.1016/j.neulet.2005.05.048
- Olney, J.W., Rhee, V., Lah Ho, O., 1974. Kainic acid: A powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Res.* 77, 507–512.
- OMS, 2016. *Epilepsia*. Nota descriptiva N° 999.
- Parent, J.M., 2007. Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus. *Prog. Brain Res.* 163, 529–541. doi:10.1016/S0079-6123(07)63028-3
- Parent, J.M., Yu, T.W., Leibowitz, R.T., Geschwind, D.H., Sloviter, R.S., Lowenstein, D.H., 1997. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17, 3727–3738.
- Patsalos, P.N., 2004. Clinical pharmacokinetics of levetiracetam. *Clin Pharmacokinet* 43, 707–724.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th

edn. ed. Academic Press/Elsevier, Amsterdam ; Boston.

- Pekcec, A., Fuest, C., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., Potschka, H., 2008. Targeting epileptogenesis-associated induction of neurogenesis by enzymatic depolysialylation of NCAM counteracts spatial learning dysfunction but fails to impact epilepsy development. *J. Neurochem.* 105, 389–400. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05172.x
- Pitkänen, A., Kharatishvili, I., Karhunen, H., Lukasiuk, K., Immonen, R., Nairismagi, J., Grohn, O., Nissinen, J., 2007. Epileptogenesis in experimental models. *Epilepsia* 48, 13–20. doi:10.1111/j.1528-1167.2007.01063.x
- Pitkänen, A., Lukasiuk, K., 2011. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol.* 10, 173–186. doi:10.1016/S1474-4422(10)70310-0
- Pitkänen, A., Lukasiuk, K., 2009. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav.* 14, 16–25. doi:10.1016/j.yebeh.2008.09.023
- Poupaert, J.H., Vandervorst, D., Guiot, P., Moustafa, M.M., Dumont, P., 1984. Structure-activity relationships of phenytoin-like anticonvulsant drugs. *J. Med. Chem.* 27, 76–78.
- PPE, 2014. *Epilepsia en México* [WWW Document]. URL <http://www.epilepsiamexico.gob.mx/que-es.htm> (consultado 1.25.17).
- Prasad, M., Pr, K., Sequeira, R., 2014. Anticonvulsant therapy for status epilepticus. *Cochrane Libr.* 1–88. doi:10.1002/14651858.CD003723.pub3
- Proper, E. a, Hoogland, G., Kappen, S.M., Jansen, G.H., Rensen, M.G.A., Schrama, L.H., van Veelen, C.W.M., van Rijen, P.C., van Nieuwenhuizen, O., Gispen, W.H., de Graan, P.N.E., 2002. Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain* 125, 32–43. doi:10.1093/brain/awf001
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33. doi:10.1016/S0014-2999(03)01272-X
- Racine, R.J., 1972a. Modification of seizure activity by electrical stimulation: I. after-discharge threshold. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32, 269–279. doi:10.1016/0013-4694(72)90176-9

- Racine, R.J., 1972b. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32, 281–294. doi:10.1016/0013-4694(72)90177-0
- Raftopoulos, R., Hickman, S.J., Toosy, A., Sharrack, B., Mallik, S., Paling, D., Altmann, D.R., Yiannakas, M.C., Malladi, P., Sheridan, R., Sarrigiannis, P.G., Hoggard, N., Koltzenburg, M., Wheeler-kingshott, C.A.M.G., Schmierer, K., Giovannoni, G., Miller, D.H., Kapoor, R., 2016. Phenytoin for neuroprotection in patients with acute optic neuritis: A randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol.* 15, 259–269. doi:10.1016/S1474-4422(16)00004-1
- Rakhade, S.N., Loeb, J. a., 2008. Focal reduction of neuronal glutamate transporters in human neocortical epilepsy. *Epilepsia* 49, 226–236. doi:10.1111/j.1528-1167.2007.01310.x
- Rigau, V., Morin, M., Rousset, M.-C., de Bock, F., Lebrun, A., Coubes, P., Picot, M.-C., Baldy-Moulinier, M., Bockaert, J., Crespel, A., Lerner-Natoli, M., 2007. Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain* 130, 1942–56. doi:10.1093/brain/awm118
- Rigo, J.-M., Hans, G., Nguyen, L., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Leprince, P., Moonen, G., Selak, I., Matagne, a, Klitgaard, H., 2002. The anti-epileptic drug levetiracetam reverses the inhibition by negative allosteric modulators of neuronal GABA- and glycine-gated currents. *Br. J. Pharmacol.* 136, 659–672. doi:10.1038/sj.bjp.0704766
- Rigoulot, M.-A., Leroy, C., Koning, E., Ferrandon, A., Nehlig, A., 2003. Prolonged low-dose caffeine exposure protects against hippocampal damage but not against the occurrence of epilepsy in the lithium-pilocarpine model in the rat. *Epilepsia* 44, 529–535.
- Rigoulot, M. a, Koning, E., Ferrandon, A., Nehlig, A., 2004. Neuroprotective properties of topiramate in the lithium-pilocarpine model of epilepsy. *Pharmacology* 308, 787–795. doi:10.1124/jpet.103.057091.TLE
- Roch, C., Leroy, C., Nehlig, A., Namer, I.J., 2002. Magnetic resonance imaging in the study of the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in adult rats. *Epilepsia* 43, 325–335.
- Rocha, L., Ondarza-Rovira, R., 1999. Characterization of benzodiazepine receptor binding following kainic acid administration: An autoradiography study in rats. *Neurosci. Lett.* 262, 211–214. doi:10.1016/S0304-3940(99)00080-4

- Rogawski, M.A., 2012. Migraine and epilepsy—Shared mechanisms within the family of episodic disorders, en: *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. pp. 1–23.
- Rollinger, J.M., Stuppner, H., Langer, T., 2008. Virtual screening for the discovery of bioactive natural products. *Prog. Drug Res.* 65, 211, 213–49. doi:10.1007/978-3-7643-8117-2_6
- Rossetti, A., Lowenstein, D., 2011. Management of refractory status epilepticus in adults: Still more questions than answers. *Lancet Neurol.* 10, 922–930. doi:10.1016/S1474-4422(11)70187-9.Management
- Routledge, E.J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., Sumpter, J.P., 1998. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153, 12–19. doi:10.1006/taap.1998.8544
- Santana-Gómez, C.E., 2012. Evaluación de los efectos del propilparabeno en el status epilepticus y daño neuronal inducido por el modelo de litio-pilocarpina. *Cinvestav*.
- Santana-Gómez, C.E., Alcántara-González, D., Luna-Munguía, H., Bañuelos-Cabrera, I., Magdaleno-Madrigal, V., Fernández-Mas, R., Besio, W., Rocha, L., 2015. Transcranial focal electrical stimulation reduces the convulsive expression and amino acid release in the hippocampus during pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Epilepsy Behav.* 49, 33–39. doi:10.1016/j.yebeh.2015.04.037
- Scharfman, H.E., Goodman, J.H., Sollas, A.L., 2000. Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: Functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J. Neurosci.* 20, 6144–58. doi:20/16/6144 [pii]
- Schumacher, J., Guo, G., 2015. Mechanistic review of drug-induced steatohepatitis. *Toxicol Appl Pharmacol* 33, 40–47. doi:10.1038/nbt.3121.ChIP-nexus
- Scimemi, A., Schorge, S., Kullmann, D.M., Walker, M.C., 2006. Epileptogenesis is associated with enhanced glutamatergic transmission in the perforant path. *J. Neurophysiol.* 95, 1213–1220. doi:10.1152/jn.00680.2005
- Scorza, F.A., Arida, R.M., Naffah-Mazzacoratti, M.D.G., Scerni, D.A., Calderazzo, L., Cavalheiro, E.A., 2009. The pilocarpine model of epilepsy: What have we learned? *An. Acad. Bras. Cienc.* 81, 345–365.

doi:10.1590/S0001-37652009000300003

- Seifert, G., Steinhäuser, C., 2013. Neuron–astrocyte signaling and epilepsy. *Exp. Neurol.* 244, 4–10. doi:10.1016/j.expneurol.2011.08.024
- Seiffert, E., Dreier, J.P., Ivens, S., Bechmann, I., Tomkins, O., Heinemann, U., Friedman, A., 2004. Lasting blood–brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *Neurobiol. Dis.* 24, 7829–7836. doi:10.1523/JNEUROSCI.1751-04.2004
- Simpkins, J.W., Rajakumar, G., Zhang, Y.Q., Simpkins, C.E., Greenwald, D., Yu, C.J., Bodor, N., Day, A.L., 1997. Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. *J. Neurosurg.* 87, 724–730. doi:10.3171/jns.1997.87.5.0724
- Sleigh, S.H., Barton, C.L., 2010. Repurposing strategies for therapeutics. *Pharmaceut. Med.* 24, 151–159. doi:10.1007/BF03256811
- Sloviter, R.S., 1999. Status epilepticus-induced neuronal injury and network reorganization. *Epilepsia* 40, 34–39. doi:10.1111/j.1528-1157.1999.tb00876.x
- Sloviter, R.S., 1987. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science* 235, 73–76. doi:10.1126/science.2879352
- Smolders, I., Khan, G.M., Manil, J., Ebinger, G., Michotte, Y., 1997. NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: Characterization in freely moving rats by microdialysis. *Br. J. Pharmacol.* 121, 1171–1179. doi:10.1038/sj.bjp.0701231
- Soni, M.G., Burdock, G. a., Taylor, S.L., Greenberg, N. a., 2001. Safety assessment of propyl paraben: A review of the published literature. *Food Chem. Toxicol.* 39, 513–532. doi:10.1016/S0278-6915(00)00162-9
- Soukupova, M., Binaschi, A., Falcicchia, C., Palma, E., Roncon, P., Zucchini, S., Simonato, M., 2015. Increased extracellular levels of glutamate in the hippocampus of chronically epileptic rats. *Neuroscience* 301, 246–53. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.06.013
- Staba, R.J., Bragin, A., 2011. High-frequency oscillations and other electrophysiological biomarkers of epilepsy: Underlying mechanisms. *Biomark. Med.* 5, 545–556. doi:10.2217/bmm.11.72.High-frequency

- Szelag, S., Zabłocka, A., Trzeciak, K., Drozd, A., Baranowska-Bosiacka, I., Kolasa, A., Goschorska, M., Chlubek, D., Gutowska, I., 2016. Propylparaben-induced disruption of energy metabolism in human HepG2 cell line leads to increased synthesis of superoxide anions and apoptosis. *Toxicol. Vitr.* 31, 30–34. doi:10.1016/j.tiv.2015.11.011
- Talevi, A., Bellera, C.L., Castro, E. a., Bruno-Blanch, L.E., 2007. A successful virtual screening application: Prediction of anticonvulsant activity in MES test of widely used pharmaceutical and food preservatives methylparaben and propylparaben. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 21, 527–538. doi:10.1007/s10822-007-9136-9
- Talevi, A., Bruno-Blanch, L.E., 2009. Screening virtual: Una herramienta eficaz para el desarrollo de nuevos fármacos en Latinoamérica. *Lat. Am. J. Pharm.* 28, 141–150.
- Tang, F.R., Lee, W.L., Yeo, T.T., 2001. Expression of the group I metabotropic glutamate receptor in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J. Neurocytol.* 30, 403–411.
- Tian, G.-F., Azmi, H., Takano, T., Xu, Q., Peng, W., Lin, J., Oberheim, N., Lou, N., Wang, X., Zielke, H.R., Kang, J., Nedergaard, M., 2005. An astrocytic basis of epilepsy. *Nat. Med.* 11, 973–981. doi:10.1038/nm1277
- Torta, R., Keller, R., 1999. Behavioral, psychotic, and anxiety disorders in epilepsy: Etiology, clinical features, and therapeutic implications. *Epilepsia* 40 Suppl 1, S2–S20. doi:10.1111/j.1528-1157.1999.tb00883.x
- Towne, A.R., Pellock, J.M., Ko, T., Delorenzo, R.J., 1994. Determinants of mortality in status epilepticus 35, 27–34.
- Treiman, D.M., 2007. Treatment of convulsive status epilepticus. *Int. Rev. Neurobiol.* 81, 273–285. doi:10.1016/S0074-7742(06)81018-4
- Trinka, E., Cock, H., Hesdorffer, D., Rossetti, A.O., Scheffer, I.E., Shinnar, S., Shorvon, S., Lowenstein, D.H., 2015. A definition and classification of status epilepticus - Report of the ILAE task force on classification of status epilepticus. *Epilepsia* 56, 1515–1523. doi:10.1111/epi.13121
- Trinka, E., Höfler, J., Zerbs, A., 2012. Causes of status epilepticus. *Epilepsia* 53, 127–138. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03622.x
- Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwarz, M., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., Turski, L., 1983. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats:

- Behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav. Brain Res.* 9, 315–335. doi:10.1016/0166-4328(83)90136-5
- Valdés-Cruz, A., Negrete-Díaz, J.V., Magdaleno-Madrigo, V.M., Martínez-Vargas, D., Fernández-Mas, R., Almazán-Alvarado, S., Torres-García, M.E., Flores, G., 2012. Electroencephalographic activity in neonatal ventral hippocampus lesion in adult rats. *Synapse* 66, 738–746. doi:10.1002/syn.21563
- Van Vliet, E.A., Araújo, S.D.C., Redeker, S., Van Schaik, R., Aronica, E., Gorter, J.A., 2007. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain* 130, 521–534. doi:10.1093/brain/awl318
- Velísková, J., Velíšek, L., Galanopoulou, S., Sperber, E.F., 2000. Neuroprotective effects of estrogens on hippocampal cells in adult female rats after status epilepticus. *Epilepsia* 41 Suppl 6, S30–S35.
- Verma, U., Sharma, R., Gupta, P., Kapoor, B., Bano, G., Sawhney, V., 2005. New uses for old drugs: Novel therapeutic options. *Indian J. Pharmacol.* 37, 279–287. doi:10.4103/0253-7613.16850
- Vezzani, A., Baram, T.Z., 2007. New roles for interleukin-1 beta in the mechanisms of epilepsy. *Epilepsy Curr.* 7, 45–50. doi:10.1111/j.1535-7511.2007.00165.x
- Vicedomini, J.P., Nadler, J.V., 1987. A model of status epilepticus based on electrical stimulation of hippocampal afferent pathways. *Exp. Neurol.* 96, 681–691. doi:10.1016/0014-4886(87)90229-9
- Vignatelli, L., Tonon, C., Alessandro, R.D., 2003. Incidence and short-term prognosis of status epilepticus in adults in Bologna, Italy. *Epilepsia* 44, 964–968.
- Wasterlain, C.G., 1974. Mortality and morbidity from serial seizures. *Epilepsia* 15, 155–176.
- Wasterlain, C.G., 1972. Breakdown of brain polysomes in status epilepticus. *Brain Res.* 39, 278–284.
- Wasterlain, C.G., Chen, J.W.Y., 2008. Mechanistic and pharmacologic aspects of status epilepticus and its treatment with new antiepileptic drugs. *Epilepsia* 49, 63–73. doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01928.x
- Waterhouse, E., 2008. The epidemiology of status epilepticus, en: Kaplan,

- P.W., Drislane, F.W. (Eds.), Nonconvulsive status epilepticus. pp. 23–40.
- Weaver, C.E., Park-Chung, M., Gibbs, T.T., Farb, D.H., 1997. 17 β -Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res.* 761, 338–341. doi:10.1016/S0006-8993(97)00449-6
- West, M.J., Slomianka, L., Gundersen, H.J.G., 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.* 231, 482–497. doi:10.1002/ar.1092310411
- Wetherington, J., Serrano, G., Dingledine, R., 2008. Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron* 58, 168–178. doi:10.1016/j.neuron.2008.04.002
- Whittington, M. a., Faulkner, H.J., Doheny, H.C., Traub, R.D., 2000. Neuronal fast oscillations as a target site for psychoactive drugs. *Pharmacol. Ther.* 86, 171–190. doi:10.1016/S0163-7258(00)00038-3
- Xie, Y., Dengler, K., Zacharias, E., Wilffert, B., Tegtmeyer, F., Gmbh, J., 1994. Effects of the sodium channel blocker tetrodotoxin (TTX) on cellular ion homeostasis in rat brain subjected to complete ischemia. *Brain Res.* 652, 216–224. doi:10.1016/0006-8993(94)90230-5
- Yan, H., Ji-qun, C., Ishihara, K., Nagayama, T., Serikawa, T., Sasa, M., 2005. Separation of antiepileptogenic and antiseizure effects of levetiracetam in the spontaneously epileptic rat (SER) 46, 1170–1177.
- Ye, Y., Xiong, J., Hu, J., Kong, M., Cheng, L., Chen, H., Li, T., Jiang, L., 2013. Altered hippocampal myelinated fiber integrity in a lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: A histopathological and stereological investigation. *Brain Res.* 1522, 76–87. doi:10.1016/j.brainres.2013.05.026
- You, Y., Bai, H., Wang, C., Chen, L.W., Liu, B., Zhang, H., Gao, G.D., 2011. Myelin damage of hippocampus and cerebral cortex in rat pentylenetetrazol model. *Brain Res.* 1381, 208–216. doi:10.1016/j.brainres.2011.01.011
- Zheng, Y., Moussally, J., Cash, S.S., Karnam, H.B., Cole, A.J., 2010. Intravenous levetiracetam in the rat pilocarpine-induced status epilepticus model: Behavioral, physiological and histological studies. *Neuropharmacology* 58, 793–798. doi:10.1016/j.neuropharm.2009.12.007
- Zhou, J.L., Zhao, Q., Holmes, G.L., 2007. Effect of levetiracetam on visual-

spatial memory following status epilepticus. *Epilepsy Res.* 73, 65–74.
doi:10.1016/j.eplepsyres.2006.08.007

Zilles, K., Qü, M.S., Köhling, R., Speckmann, E.J., 1999. Ionotropic glutamate and GABA receptors in human epileptic neocortical tissue: quantitative in vitro receptor autoradiography. *Neuroscience* 94, 1051–1061.
doi:10.1016/S0306-4522(99)00392-9

Zona, C., Niespodziany, I., Marchetti, C., Klitgaard, H., Bernardi, G., Margineanu, D.G., 2001. Levetiracetam does not modulate neuronal voltage-gated Na⁺ and T-type Ca²⁺ currents. *Seizure* 10, 279–286.
doi:10.1053/seiz.2000.0504

Anexo

Tipo: Artículo de investigación

Autores: **Santana-Gómez C.E.**, Orozco-Suárez S.A., Talevi A, Bruno-Blanch L., Magdaleno-Madrigal V.M., Fernández-Mas R., Rocha L.

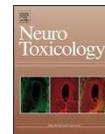
Título: Propylparaben applied after pilocarpine-induced status epilepticus modifies hippocampal excitability and glutamate release in rats.

Revista: Journal of Neurotoxicology. 2017.

Año: 2017

Volumen: 59

Páginas: 110-120



Propylparaben applied after pilocarpine-induced status epilepticus modifies hippocampal excitability and glutamate release in rats



César Emmanuel Santana-Gómez^a, Sandra Adela Orozco-Suárez^b, Alan Talevi^c,
Luis Bruno-Blanch^c, Víctor Manuel Magdaleno-Madriral^d, Rodrigo Fernández-Mas^d,
Luisa Rocha^{a,*}

^a Department of Pharmacobiology, Center for Research and Advanced Studies (CINVESTAV), Mexico City, Mexico

^b Unit for Medical Research in Neurological Diseases, Specialties Hospital, National Medical Center SXXI (CMN-SXXI), Mexico City, Mexico

^c Medicinal Chemistry, Department of Biological Sciences, Faculty of Exact Sciences, National University of La Plata, Buenos Aires, Argentina

^d Department of Neuroscience Research, National Institute of Psychiatry Ramon de la Fuente Muñiz, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 June 2016
Received in revised form 6 January 2017
Accepted 31 January 2017
Available online 4 February 2017

Keywords:

Neuroprotection
Glutamate
Cell damage
Electrographic activity
Neuronal excitability

ABSTRACT

Propylparaben (PPB) induces cardioprotection after ischemia–reperfusion injury by inhibiting voltage-dependent Na⁺ channels. The present study focuses on investigating whether the i.p. application of 178 mg/kg PPB after pilocarpine-induced status epilepticus (SE) reduces the acute and long-term consequences of seizure activity. Initially, we investigated the effects of a single administration of PPB after SE. Our results revealed that compared to rats receiving diazepam (DZP) plus vehicle after 2 h of SE, animals receiving a single dose of PPB 1 h after DZP injection presented 126% ($p < 0.001$) lower extracellular levels of glutamate in the hippocampus. This effect was associated with an increased potency of low-frequency oscillations (0.1–13 Hz bands, $p < 0.001$), a reduced potency of 30–250 Hz bands ($p < 0.001$) and less neuronal damage in the hippocampus. The second experiment examined whether the subchronic administration of PPB during the post-SE period is able to prevent the long-term consequences of seizure activity. In comparison to animals that were treated subchronically with vehicle after SE, rats administered with PPB for 5 days presented lower hippocampal excitability and interictal glutamate release, astrogliosis, and neuroprotection in the dentate gyrus. Our data indicate that PPB, when applied after SE, can be used as a therapeutic strategy to reduce the consequences of seizure activity.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The antimicrobial agent propylparaben (PPB) has been widely used as a preservative in drugs, cosmetics and food for more than 60 years (Soni et al., 2001). Using the Central Nervous System Multiparameter Optimization and Desirability Score (CNS MPO) developed by Wager et al. (2010), it was predicted that PPB can act in the brain due to its physicochemical properties, i.e., favorable permeability, metabolic stability and low P-glycoprotein efflux. This prediction and previous evidence obtained in dogs indicate that PPB reaches the brain tissue when applied systemically (Jones et al., 1956).

Studies have revealed that PPB blocks voltage-gated Na⁺ channels in cardiomyocytes and induces cardioprotection in rats

after ischemia–reperfusion injury (Ji et al., 2004). The data obtained in our laboratory show that PPB blocks Na⁺ channels and decreases neuronal excitability in vitro (Lara-Valderrábano et al., 2016). Because Na⁺ channels participate in the generation of nerve impulses that trigger the release of neurotransmitters such as glutamate, their blockage by PPB may induce inhibitory effects in the brain (Talevi et al., 2007). In addition, PPB may induce neuroprotection under conditions in which high glutamatergic neurotransmission leads to neuronal hyperexcitability and damage due to the overactivation of Na⁺ channels.

Status epilepticus (SE) and epilepsy are associated with augmented extracellular levels of glutamate (Santana-Gómez et al., 2015; Soukupova et al., 2015). High glutamate levels and glutamatergic receptor activation have been associated with excitotoxicity and neuronal death in several structures of subjects experiencing SE (Fujikawa, 1996; Isokawa and Mello, 1991). However, at present, no effective pharmacological treatment is available to prevent neuronal damage after seizure activity (Kobov

* Corresponding author.

E-mail address: lrocha@cinvestav.mx (L. Rocha).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2017.01.009>

0161-813X/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

et al., 2012; Pitkänen and Lukasiuk, 2011; Rogawski and Löscher, 2004).

The present study investigated whether a single administration of PPB lessens the augmented release of glutamate and neuronal damage in hippocampus that are produced by pilocarpine-induced SE. We also investigated whether subchronic treatment with PPB after pilocarpine-induced SE can prevent the elevated glutamate release, neuronal loss, and hyperexcitability that occur in the hippocampus during chronic epileptic periods.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (250–300 g) were maintained individually in acrylic cages under controlled environmental conditions (12-h light/dark cycles; temperature, 22 °C) with access to food and water ad libitum. All experiments were performed in accordance with the Mexican Official Norm (NOM-062-ZOO-1999) and with the approval of the Internal Committee for the Care and Use of Laboratory Animals of the Center for Research and Advanced Studies (project 512-12). All efforts were made to reduce the number of animals used and to minimize their suffering.

2.2. Surgery

The animals were anesthetized with a mixture of ketamine (80 mg/kg, i.p.) and xylazine (20 mg/kg, i.m.). Next, the rats were stereotactically implanted with a guide cannula attached to a bipolar electrode that comprised two twisted strands of stainless steel wire, which were insulated except at the cross-section of their tips, into the right ventral hippocampus. The following coordinates

relative to bregma were used: anteroposterior, –5.3 mm; lateral, 5.2 mm; and skull surface depth, 7.5 mm for the electrode and –4.5 mm for the cannula (Paxinos and Watson, 1998). The electrode was attached to male connector pins. Stainless steel screws were threaded into the cranium over the frontal cortex to fix the electrode assembly to the skull with dental acrylic. The animals were allowed to recover for 7 days before further manipulation. After the recovery period, the rats received a daily administration of saline solution (1 ml/kg, i.p.) for 5 days to habituate them to manipulation.

2.3. Experiment 1: effects of PPB on the short-term consequences of SE

This experiment was designed to determine whether a single dose of PPB after diazepam (DZP) administration can modify the pilocarpine-induced electrographic activity, high release of glutamate and neuronal damage in the hippocampus of rats receiving this treatment (Fig. 1).

2.3.1. SE-PPB group (n = 5)

Following habituation, a microdialysis probe, which was constructed according to Maidment et al. (1989) and designed to protrude 3 mm beyond the cannula tip in the ventral hippocampus, was inserted into the guide cannula and then fixed to the socket with dental acrylic. A polyacrylonitrile membrane (molecular weight cutoff of 40,000 Da) was the active part of the dialysis probe. The dialysis system was continuously perfused with fresh artificial cerebrospinal fluid (previously filtered and sterilized; concentrations in mM: sodium chloride 125, potassium chloride 2.5, sodium dihydrogen phosphate 0.5, sodium hydrogen phosphate 5, magnesium chloride 1, ascorbic acid 0.2, calcium chloride 1.2; pH 7.4) during the microdialysis experiment at a flow

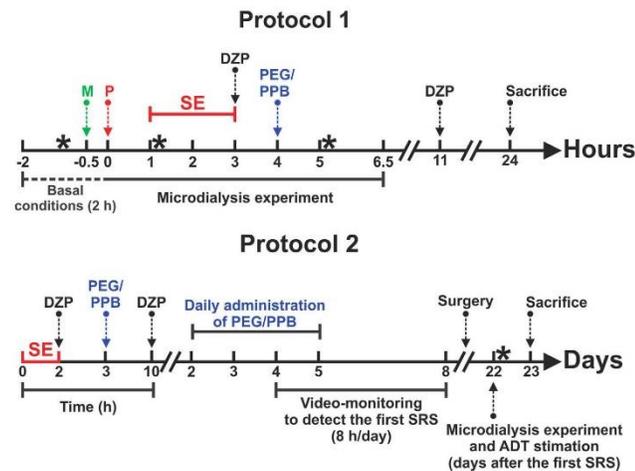


Fig. 1. Schematic representation of the experimental protocols used to determine the effects of PPB during the post-SE period (Protocol 1) and the chronic epileptic period (Protocol 2). Protocol 1: Rats previously implanted with a bipolar electrode attached to a microdialysis cannula in the hippocampus were submitted to a microdialysis experiment (see Section 2.3.1). The diagram illustrates the experimental protocol used to administer the various drugs to induce SE (methylscopolamine, M; pilocarpine, P) and stop the convulsive activity (DZP). Notice that PPB or vehicle was applied 1 h after the first administration of DZP. Protocol 2: Animals previously submitted to pilocarpine-induced SE received subchronic PPB or vehicle for 5 days. The animals were then recorded using a video-monitoring system to identify the first SRS, after which they were implanted with a cannula/electrode in the hippocampus. Microdialysis experiments and ADT estimation were carried out 22 days following the occurrence of the first SRS. All animals were killed 24 h after the microdialysis experiment. Asterisks indicate the schedule used to obtain 1 min electrographic recordings for subsequent analysis using Fast Fourier Transform methods (see Section 2.6) for Protocol 1 (during the basal condition, 5 min after the establishment of SE and 60 min following PPB administration) and Protocol 2 (during the interictal period).

rate of 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Following a stabilization period (2 h), dialysates were recovered every 30 min during a 2-h period to evaluate extracellular glutamate levels under baseline conditions. At the end of the basal period, the animals were administered a muscarinic receptor antagonist (methylscopolamine, 2 mg/kg, i. p.) to minimize the peripheral cholinergic effects induced by pilocarpine. Pilocarpine (300 mg/kg, i.p.) was injected 30 min after the methylscopolamine. The latency to the establishment of SE was then evaluated. The onset of SE was determined as the time at which the animals showed seizures continuously for more than 2 min without recovery between them. To stop the behavioral convulsive seizures, the rats were given DZP at 2 and 10 h after the onset of SE (2.5 and 1.25 mg/kg, i.m., respectively). This treatment reduces the mortality rate induced by SE via DZP-induced myorelaxant effects but does not revert the epileptiform activity or elevated glutamate release in the hippocampus (François et al., 2011; Roch et al., 2002; Santana-Gómez et al., 2015). One hour after the first DZP administration, a single 178-mg/kg dose of PPB diluted in polyethylene glycol (PEG) 30% was administered i.p. in a total volume of 10 ml/kg. This dose was chosen based on a preliminary study in our laboratory, in which we evaluated the dose-response anticonvulsant effects of PPB when applied 30 min before pilocarpine injection. The results obtained from those experiments revealed that PPB pretreatment does not modify the expression of clonic seizures but does avoid tonic-clonic convulsions in 50% of animals when administered at 178 mg/kg, i.p. (data not shown). Electrographic activity in the ventral hippocampus was recorded during the entire observation period (from basal conditions to 6.5 h after pilocarpine injection). The results were evaluated for one-minute periods under different experimental conditions using Fast Fourier Transforms (see Section 2.6): basal condition, 5 min after the establishment of SE, and 60 min following PPB administration (corresponding to 4 h after the establishment of SE). After recovery, the perfusates were diluted with perchloric acid (HClO_4 , 2 N) (1:20) and assayed to determine extracellular glutamate levels (see Section 2.6). Twenty-four hours after pilocarpine administration, the animals were anesthetized and perfused, and their brains were used in subsequent histological procedures (see Section 2.9) (Fig. 1).

2.3.2. SE-PEG group (n = 7)

The animals were manipulated as described above for the SE-PPB group, except that the animals were given PEG (10 ml/kg, i.p.) instead of PPB (Fig. 1).

2.4. Experiment 2: effects of subchronic PPB administration on the long-term consequences of SE

It is known that over the long term after SE, animals present spontaneous recurrent seizures (SRS), a condition that is associated with high neuronal excitability and elevated glutamate release, as well as neuronal damage and gliosis in the hippocampus. This experiment was designed to determine whether the subchronic administration of PPB during the post-SE period can modify these consequences in the hippocampus during the chronic epileptic period (Fig. 1).

2.4.1. SRS-PPB group (n = 5)

Following habituation, rats were subjected to SE (see Section 2.3.1). Two hours after SE, the convulsive behavioral activity was stopped using two doses of DZP as previously described (see Section 2.3.1). PPB (178 mg/kg, i.p.) was injected daily for 5 days starting one hour after the first DZP injection. The latency to the onset of the first SRS was determined by video-monitoring the animal's behavior for 8 h each day. Seven days after the onset of the first SRS, the rats were implanted with a bipolar electrode and a

guide cannula (see Section 2.2). The animals were subjected to microdialysis experiments (see Section 2.3.1) 22 days after the occurrence of the first SRS to determine the glutamate released during the interictal period (the period between seizures). Throughout the microdialysis procedure, electrographic recordings were obtained and used to calculate power spectra (see Section 2.6). The afterdischarge threshold (ADT) of the ventral hippocampus was determined to estimate neuronal excitability in this brain area (see Section 2.7) (Racine, 1972). Twenty-four hours after the microdialysis experiment, the animals were killed, and the brain was examined in subsequent histological procedures (see Section 2.9) (Fig. 1).

2.4.2. SRS-PEG group (n = 6)

The animals were handled in the same way as that described for the SE-PPB group (Section 2.4.1), except they were given subchronic PEG (10 ml/kg, i.p.) instead of PPB (Fig. 1).

2.5. Control group (n = 8)

The rats were implanted and submitted to manipulation as described above (see Section 2.3.1) except that they received only saline solution during the microdialysis experiment. The animals were evaluated in terms of electrographic activity, ADT, glutamate release and neuronal damage in the hippocampus and were also examined under basal conditions.

2.6. Evaluation of hippocampal electrographic activity

Hippocampal electrographic activity was recorded using a model P511 amplifier (Grass, MA, USA); the signals were amplified, band-pass filtered between 0.1 and 250 Hz, digitized at 1000 samples/s and stored on an optical disk. Off-line spectral analyses using Fast Fourier Transform methods (one-minute periods) at each stage of interest were performed using the ADQ8 software, which was developed at the National Institute of Psychiatry "Ramon de la Fuente Muñiz", Mexico (Fernández-Mas et al., 1998; Valdés-Cruz et al., 2012). The signals were undersampled to the final power spectra bandwidth. We applied a finite impulse response filter tuned to the stimulation frequency to remove associated artifacts. Artifact-free recordings were segmented in consecutive epochs of 60 s for each subject and experimental condition. Power spectra were then calculated for each epoch and averaged. To eliminate interindividual variance in the absolute electrographic power, the spectra were normalized by expressing each power estimation for each frequency step (0.1–4 Hz, 4–8 Hz, 8–13 Hz, 13–30 Hz, 30–90 Hz and 90–250 Hz) as a percentage of total power (the mean of all power estimates) in a frequency window. This power estimation is termed relative power. Power spectra were normalized separately for each subject and experimental condition. The values are presented as relative power and evaluated by one-way ANOVA test followed by a Fisher's LSD post-hoc (acute study) or by t-Student analysis (chronic experiment).

2.7. Estimation of hippocampal excitability

Hippocampal ADT values were used to estimate the excitability of this brain area. ADT is defined as the minimum current necessary to produce a behavioral response and/or electroencephalographic afterdischarge with a duration of at least 3 s. ADT was determined by delivering a series of stimulations to the right ventral hippocampus (1 ms rectangular pulses, 60 Hz for 1 s) at 1 min intervals, beginning at 10 mA and increasing in increments of approximately 20% of the previous current (Racine, 1972). The ADT values were analyzed using one-way ANOVA tests followed by a

post hoc Fisher's LSD test, and the results are expressed as the means \pm SEM of the current required (μ A) for ADT generation.

2.8. High-performance liquid chromatography (HPLC)

For the separation and quantification of glutamate, 16 μ l of the test mixture (perfusate-HClO₄) was mixed with 6 μ l of o-phthalaldehyde (OPA), agitated for 30 s and injected into the solvent stream of an HPLC system 1.5 min later. The HPLC system comprised a fluorescence detector operating at an excitation wavelength of 360 nm and an emission wavelength of 450 nm. The HPLC fluorometric detection procedure for amino acid quantitation required the OPA-amino acids to be separated on a reversed-phase 3.9 mm \times 150 mm column (Nova-Pack, 4 μ m, C₁₈, Waters[®]) using solution A (sodium acetate dissolved in 90% milli-Q[®] water and 10% methanol; pH 5.75) as aqueous solvent and solution B (20% solution A and 80% methanol; pH 6.75) as the other mobile phase at a flow rate of 0.5 ml/min (Waters[®] model 474). Glutamate was quantified by comparing peak height measurements of samples against those of standard solutions (Kendrick et al., 1988). Glutamate levels were expressed in units of μ M and as percent changes with respect to basal conditions. The glutamate release results were analyzed using one-way ANOVA followed by a post hoc Fisher's LSD test.

2.9. Histological analysis

The animals were overdosed on pentobarbital and were first transcardially perfused with saline solution (0.9%) containing heparin (1 mg/l) and then with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer solution (monobasic sodium phosphate and sodium hydroxide; pH 7.4). The brain was removed, post-fixed for one week at 4°C, and then embedded in paraffin. Coronal serial sections of 5 μ m thickness were cut with a microtome at the level of the dorsal and ventral hippocampus. The sections were deparaffinized and hydrated in water for subsequent processing to evaluate the site of cannula and electrode implantation (Nissl staining) and to visualize neuron nuclei (NeuN immunofluorescence) and neurons undergoing damage (Fluoro-Jade B). Astroglia (GFAP immunofluorescence) was evaluated only in cerebral sections obtained from animals in the control, SRS-PEG and SRS-PPB groups.

2.9.1. NeuN-GFAP immunofluorescence

The slides were exposed to citrate buffer (sodium citrate and citric acid; pH 6.0) for 2 min and stirred for 20 min. The slides were then washed three times (5 min each time) in phosphate-buffered saline (PBS; containing sodium dihydrogen phosphate, sodium chloride, potassium chloride and potassium hydrogen phosphate; pH 7.4) and incubated in a blocking solution (goat serum 5% and bovine serum albumin (BSA) 3%) containing Triton X (0.3%) for 2 h. Sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies (anti-NeuN (1:100, #MAB3077 Millipore) and anti-GFAP (1:500, #Z0334 DAKO)). Thereafter, the slides were rinsed three times with PBS and incubated with secondary antibodies (anti-mouse Alexa Fluor 488 and anti-rabbit Alexa Fluor 648 Molecular Probes[®], Invitrogen[™]) for 2 h at room temperature. The sections were counterstained with 4,6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) and coverslipped with Vectashield (Vector Labs).

2.9.2. Fluoro-Jade B staining

The slides were immersed in a solution containing 1% sodium hydroxide and 80% alcohol for 5 min, followed by 70% ethanol for 2 min and distilled water for 2 min. The slides were then transferred to a 0.06% potassium permanganate solution for 20 min and then rinsed in distilled water for 2 min. Next, the slides were incubated in a Fluoro-Jade B solution (0.0004%, Histo-Chem, Inc.) for 24 h. After rinsing 3 times (1 min each time) in distilled water, the slides were dried. Finally, the slides were immersed in xylene for 1 min and then mounted in a synthetic resin (Entellan[®], Merck Millipore) (Schmued et al., 1997).

2.9.3. Cell counting

Two investigators who were blinded to the classification of the tissue performed the cell count. Sections were examined under a Zeiss Axiovert 40 CFL microscope, and digitized images were obtained using Axiovision 4.8 software (Carl Zeiss MicroImaging, Germany). The average cell density per unit of volume was determined in the dentate gyrus (DG), hilus, CA1, and CA3 in the dorsal and ventral hippocampus using the optical fractional counting method (Besio et al., 2013; West et al., 1991). Briefly, three serial sections (5 μ m in thickness) of the dorsal and ventral hippocampus were evaluated. In this case, the sampling fraction (*ssf*) was 1/5. The area sampling fraction (*asf*) = area (frame)/area (*x*, *y* step) was calculated, and this fraction was considered the counting frame (0.460 mm \times 0.600 mm). Then, the thickness

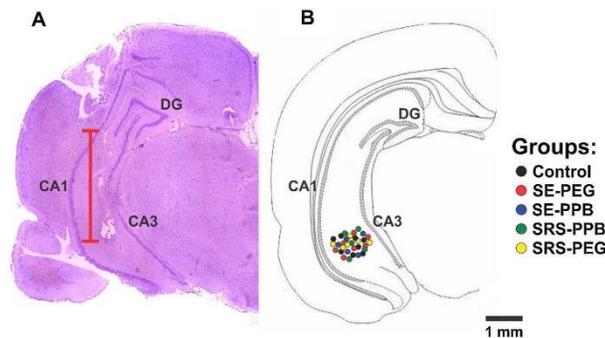


Fig. 2. (A) Representative microphotograph of a coronal section labeled with Nissl staining showing the area of electrode-cannula implantation in the ventral hippocampus. The red line indicates the placement of the microdialysis membrane. (B) A diagram indicating the area at -5.28 mm from Bregma (modified from Paxinos and Watson, 1998), indicating that the electrode-cannula tips were implanted in the ventral hippocampus of all animals in the evaluated experimental groups. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

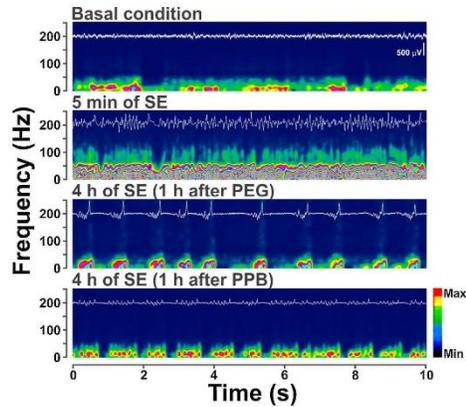


Fig. 3. Time–frequency representation of the power spectrum (0.1–250 Hz) of the electrographic activity measured under different experimental conditions. Red indicates the highest energy and blue indicates the lowest. In comparison with basal conditions (first panel), the electrical activity presents a significant enhancement at all frequencies when evaluated at 5 min after the establishment of the SE (second panel). The activity at high voltage and frequency is maintained at 4 h after the beginning of SE despite the administration of DZP plus vehicle (third panel). In contrast, animals that received DZP plus PPB showed reduced hypersynchronous high activity at low voltage at 4 h after the beginning of the SE (lower panel). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

sampling fraction was estimated as the disector height (h) relative to the section thickness t (t/h). The number of cells was calculated using the following formula: $N = (\sum Q^-) \times (t/h) \times (1/asf) \times (1/ssf)$. In this formula, Q^- represents the number of cells in a known volume fraction of each area of the hippocampus (West et al., 1991). The cell count values were analyzed using one-way ANOVA followed by a Bonferroni post hoc multiple comparison test (NeuN staining)

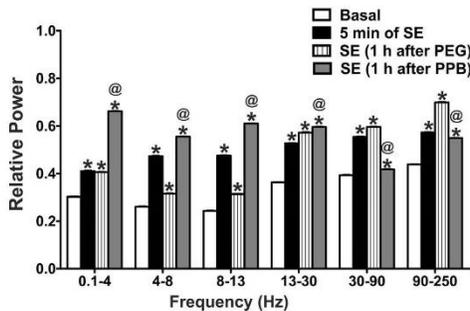


Fig. 4. Representation of relative power spectral analyses of the hippocampal electrical activity under various experimental conditions: basal conditions (open bars); 5 min after the establishment of SE (black bars); and 4 h after the beginning of SE in animals that received DZP plus vehicle (bars with vertical lines) or DZP plus PPB (gray bars). Note the increase in the relative power of low-frequency oscillations in the electrographic activity of animals that were treated with DZP plus PPB; this compares with the SE-PEG group, wherein high-frequency oscillations prevailed. Values represent means \pm standard errors, * $p < 0.001$ compared with basal conditions; @ $p < 0.001$ compared with the SE-PEG group.

and Student's t -test (Fluoro-Jade B staining). Values are expressed as the means \pm SEM number of cells per mm^3 .

3. Results

Histological analysis showed that the tips of the electrodes and the microdialysis cannula were implanted within the ventral hippocampus in all animals evaluated in the present study (Fig. 2).

3.1. Control group

Rats in the control group did not show behavioral or electrographic changes during the experimental procedure. Hippocampal electrographic activity demonstrated a homogeneous prevalence of all bands analyzed (Figs. 3 and 4). ADT values were $143 \pm 35 \mu\text{A}$, and extracellular levels of glutamate ($1.20 \pm 0.30 \mu\text{M}$) were stable throughout the microdialysis experiments (Fig. 5). Histological analysis revealed NeuN immunopositive cells in the dorsal (DG, 5397 ± 331 ; hilus, 1078 ± 19 ; CA1, 1293 ± 59 and CA3, 1442 ± 192 neuronal nuclei per mm^3) and ventral hippocampus (DG, 3857 ± 375 ; hilus, 1036 ± 38 ; CA1, 1629 ± 73 and CA3, 1161 ± 41 neuronal nuclei per mm^3). Scarce neurons undergoing death

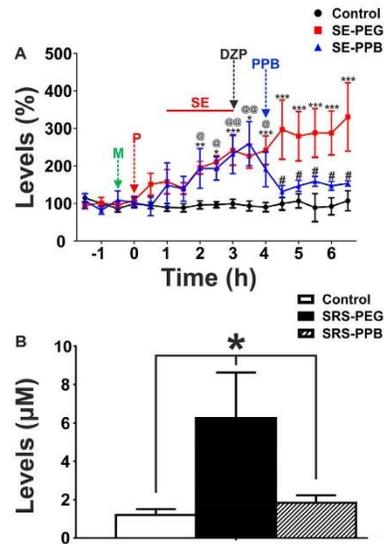


Fig. 5. (A) Glutamate release in the hippocampi of rats in the control, SE-PEG and SE-PPB groups. In the SE-PEG group, glutamate release is progressively augmented after pilocarpine administration, an effect that was maintained despite DZP injection. In contrast, PPB administration after DZP injection reduced glutamate release in the SE-PPB group. Values represent means \pm standard errors of the percentage of change from release under basal conditions. SE-PEG group: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to basal conditions. SE-PPB group: @ $p < 0.01$, @@ $p < 0.001$ compared to basal conditions. * $p < 0.001$ compared to the SE-PEG group under similar experimental conditions. M, methylscopolamine administration; P, pilocarpine administration; SE period; DZP administration; PPB administration. (B) Extracellular levels (μM) of glutamate in the hippocampi of control rats and during the interictal period of animals with SRS (the SRS-PEG and SRS-PPB groups, respectively). Note the higher levels of glutamate in the SRS-PEG group compared with that in the control and SRS-PPB groups. Values represent means \pm standard errors. * $p < 0.05$ compared to the control and SRS-PPB groups.

(Fluoro-Jade B staining) and astroglial cells (GFAP immunofluorescence) were detected in the areas evaluated (Figs. 6–8).

3.2. A single dose of PPB decreases the acute consequences of SE

3.2.1. SE-PEG group

Under basal conditions, the electrographic activity of rats in the SE-PEG group was similar to that of rats in the control group. The rats reached the SE at 43.2 ± 2.5 min after pilocarpine administration, a situation that was associated with faster, high-voltage rhythmic spikes, an increase in spectral potency in 0.1–250 Hz bands ($p < 0.001$, compared with basal conditions), and a progressive rise in glutamate release. After the first DZP injection, the animals showed reduced convulsive activity, diminished amplitude and frequency of the epileptiform activity and reduced power in the 4–8 and 8–13 Hz bands ($p < 0.001$). However, increases in the high-frequency oscillations bands (13–250 Hz, $p < 0.001$) and glutamate release (230% compared with basal conditions, $p < 0.001$) were still evident at the end of the experiment, 5.5 h after SE establishment (2.5 h after PEG) (Figs. 3–5).

Compared with the rats in the control group, those in the SE-PEG group showed a decrease in the number of NeuN-immunopositive cells in the hippocampus (Dorsal: DG, 29%, $p = 0.0301$; hilus, 47%, $p = 0.012$; CA1, 67%, $p = 0.003$ and CA3, 57%, $p = 0.015$; Ventral: DG, 63%, $p = 0.008$; hilus, 73%, $p < 0.001$; CA1, 65%, $p = 0.002$ and CA3, 64%, $p = 0.013$). A high number of Fluoro-Jade

B-staining cells were also seen in the hippocampus (Dorsal: DG, 1040.29 ± 829.65 ; hilus, 536.31 ± 182.27 ; CA1, 608.30 ± 271.00 and CA3, 600.96 ± 203.16 neurons per mm^2 ; Ventral: DG, 671.00 ± 307.25 ; hilus, 429.78 ± 141.76 ; CA1, 634.75 ± 412.55 and CA3, 514.76 ± 148.11 neurons per mm^2) (Figs. 6 and 7).

3.2.2. SE-PPB group

Animals in the SE-PPB group achieved SE at 40.3 ± 2.0 min after pilocarpine injection. During SE, animals in the SE-PPB group showed a pattern of glutamate release and electrographic activity that was similar to that seen in the SE-PEG group. The epileptiform activity progressively decreased when PPB was applied. This effect was correlated with the following changes: (a) an increase in the power of low-frequency activity (0.1–13 Hz bands, $p < 0.001$); (b) a reduced potency of high-frequency activity (30–250 Hz bands, $p < 0.001$); and (c) a significant decrease in the release of glutamate (126% lower with respect to the SE-PEG group, $p < 0.001$). These changes were evident from 30 min to 2.5 h after PPB injection (i.e., 5.5 h after SE establishment) (Figs. 3–5).

When compared with rats in the SE-PEG group, animals in the SE-PPB group showed higher numbers of NeuN-immunopositive cells in the hippocampus (Dorsal: DG, 30%, $p = 0.13$; hilus, 115%, $p = 0.003$; CA1, 197%, $p = 0.004$ and CA3, 170%, $p = 0.004$; Ventral: DG, 117%, $p = 0.046$; hilus, 245%, $p < 0.001$; CA1, 174%, $p = 0.003$ and CA3, 171%, $p = 0.016$) and presented lower numbers of cells undergoing damage (Fluoro-Jade B staining) in this brain area (Dorsal: DG, 81%, $p < 0.001$; hilus, 55%, $p < 0.001$; CA1, 98%,

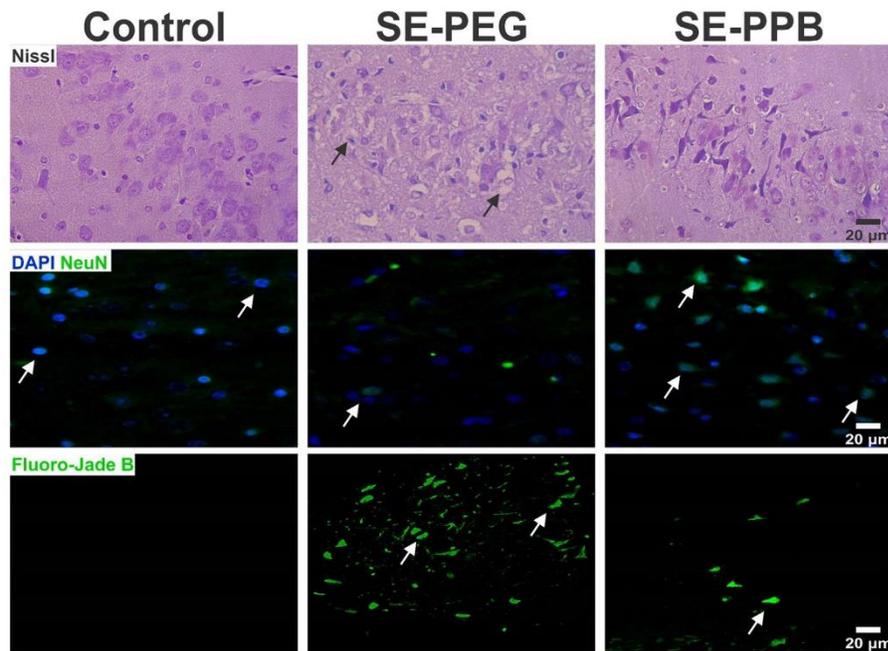


Fig. 6. Representative microphotographs of coronal sections of hilus at the dorsal hippocampus of rats in the control group and in animals receiving DZP plus vehicle (SE-PEG group) or DZP plus PPB (SE-PPB group) during the post-SE period. The sections were stained with Nissl (upper panels), NeuN-DAPI (middle panels) or Fluoro-Jade B (bottom panels). In contrast with the control tissue, SE-PEG animals showed decreased neuronal preservation (NeuN-DAPI), a condition that is associated with augmented cellular damage (Fluoro-Jade B). These changes were less evident in the sections obtained from animals in the SE-PPB group.

$p < 0.001$ and CA3, 86%, $p < 0.001$; Ventral: DG, 70%, $p = 0.006$; hilus, 91%, $p < 0.001$; CA1, 96%, $p < 0.001$ and CA3, 88%, $p = 0.004$) (Figs. 6 and 7).

3.3. Subchronic administration of PPB during the early post-SE period reduces long-term hippocampal hyperexcitability and glutamate release

3.3.1. SRS-PEG group

Animals in the SRS-PEG group presented the first spontaneous motor seizure at 4.7 ± 1.6 days after the SE with a seizure frequency of 8.7 ± 1.7 seizures per day. Analysis of the electrographic activity during the chronic epileptic period demonstrated interictal spontaneous high voltage spikes in the hippocampus with a high prevalence of all oscillations evaluated. This condition was associated with high extracellular levels of glutamate (a 420% increase relative to the control group, $p = 0.021$) and augmented hippocampal excitability revealed by low ADT values ($36.67 \pm 12.18 \mu\text{A}$; 74% lower than the control group, $p = 0.029$) (Figs. 5 and 9).

The histological analysis indicated lower numbers of NeuN immunopositive cells in the hippocampus (Dorsal: DG, 38%, $p = 0.003$; hilus, 61%, $p = 0.005$; CA1, 77%, $p = 0.001$ and CA3, 54%, $p = 0.005$; Ventral: DG, 65%, $p = 0.027$; hilus, 77%, $p = 0.001$; CA1, 73%, $p = 0.001$ and CA3, 66%, $p < 0.001$) compared with the control group. A high number of Fluoro-Jade B-positive cells were also seen in the hippocampus (Dorsal: DG, 61 ± 3 ; hilus, 29 ± 23 ; CA1, 244 ± 63 and CA3, 101 ± 12 , cells per mm^2 ; Ventral: DG, 56 ± 10 ; hilus, 21 ± 22 ; CA1 836 ± 69 and CA3, 330 ± 66 cells per mm^2). Strong GFAP-immunoreactivity, which is characteristic of astrogliosis, was detected in the evaluated areas, mainly in the hilar region (Figs. 7 and 8).

3.3.2. SRS-PPB group

Animals in the SRS-PPB group presented the first spontaneous behavioral convulsion at a similar latency (5.2 ± 1.8 days after SE, $p = 0.395$) but the daily seizure frequency was significantly lower (3.3 ± 0.9 seizures per day, 62% less, $p = 0.0161$, when compared with SRS-PEG group). The analysis of interictal hippocampal electrographic activity showed a lower relative power of all analyzed bands ($p < 0.001$) (Fig. 9). In this experimental group, interictal extracellular levels of glutamate and ADT values achieved control conditions ($1.84 \pm 0.39 \mu\text{M}$, $p = 0.22$ and $161 \pm 32 \mu\text{A}$, $p = 0.131$, respectively) (Fig. 5).

Histological analysis revealed that in the dorsal and ventral DG of rats in the SRS-PPB group, the numbers of NeuN-immunopositive cells and neurons labeled with Fluoro-Jade B were similar to those of rats in the control group. On the other hand, hilus, CA1 and CA3 of the dorsal hippocampus showed fewer NeuN-immunopositive cells and greater Fluoro-Jade B staining. Indeed, values obtained for hilus and CA3 were significantly higher than those found in the SRS-PEG group (238%, $p = 0.038$ and 206%, $p = 0.004$, respectively). In the ventral hippocampus, the numbers of NeuN-immunopositive cells in hilus, CA1 and CA3 were similar to those in the control group. However, Fluoro-Jade B staining revealed that a high number of these cells were undergoing death. GFAP immunoreactivity in all hippocampal areas evaluated in the SRS-PPB group was similar to that detected under control conditions (Figs. 5 and 8).

4. Discussion

Extracellular levels of glutamate are increased during ictal and interictal periods in the brains of subjects with SE or epilepsy (During and Spencer, 1993; Luna-Munigua et al., 2011; Santana-Gómez et al., 2015). The increased glutamatergic

neurotransmission of subjects with SE is involved in NMDA receptor-mediated excitotoxicity, especially in pyramidal and granular cells of the hippocampus (Fujikawa, 1995; Isokawa and Mello, 1991). This situation has been associated with neuronal damage, the development of SRS (epileptogenesis) and neurocognitive impairment (Cunha et al., 2009; Koch et al., 2002).

Our experiments revealed that the administration of DZP combined with PPB lessened the increased glutamate release and neuronal excitability that are induced by SE. It is known that the blockage of Na^+ channels reduces glutamate release and attenuates cellular damage (Calabresi et al., 2003; Xie et al., 1994). The inhibition of voltage-dependent Na^+ channels in hippocampal neurons by PPB (Lara-Valderrábano et al., 2016) can participate in

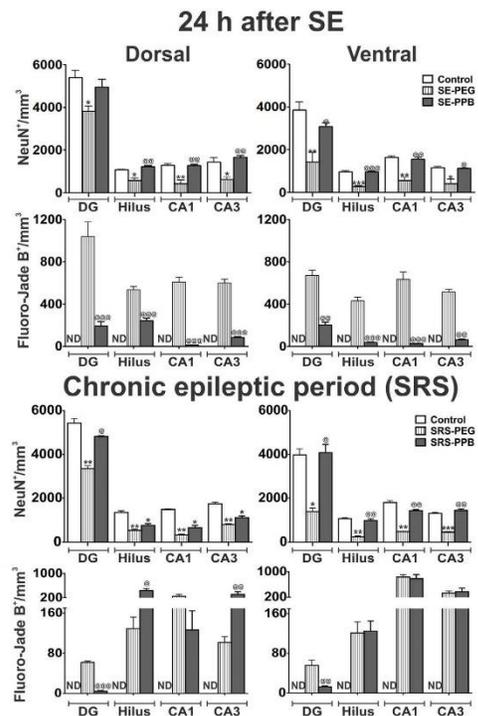


Fig. 7. Upper panel: a graphic representation of neuronal preservation and damage in the hippocampus as evaluated at 24 h after SE induction. Note the low neuronal count (NeuN staining) and the high number of cells undergoing death (Fluoro-Jade B staining) in all areas of the dorsal and ventral hippocampus of animals in the SE-PEG group that were killed at 24 h after SE. In contrast, rats from the SE-PPB group demonstrated neuronal preservation similar to that seen in the control group and a low number of cells undergoing death. Lower panel: illustration of neuronal preservation and damage in the dorsal and ventral hippocampus of animals that were evaluated during the chronic epileptic period. Animals in the SRS-PEG group presented low neuronal counts and high numbers of cells undergoing death in all areas of the hippocampus. Dorsal and ventral DG of rats in the SRS-PPB group showed neuronal preservation that was similar to that seen in rats in the control group, which was associated with a low number of cells labeled with Fluoro-Jade B. In contrast, hilus, CA1 and CA3 of these animals presented high numbers of cells undergoing death. Values represent means \pm standard errors per mm^2 . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with the control group. @ $p < 0.05$, @@ $p < 0.01$, @@@ $p < 0.001$ compared with the SE-PEG and SRS-PEG groups. ND, not determined.

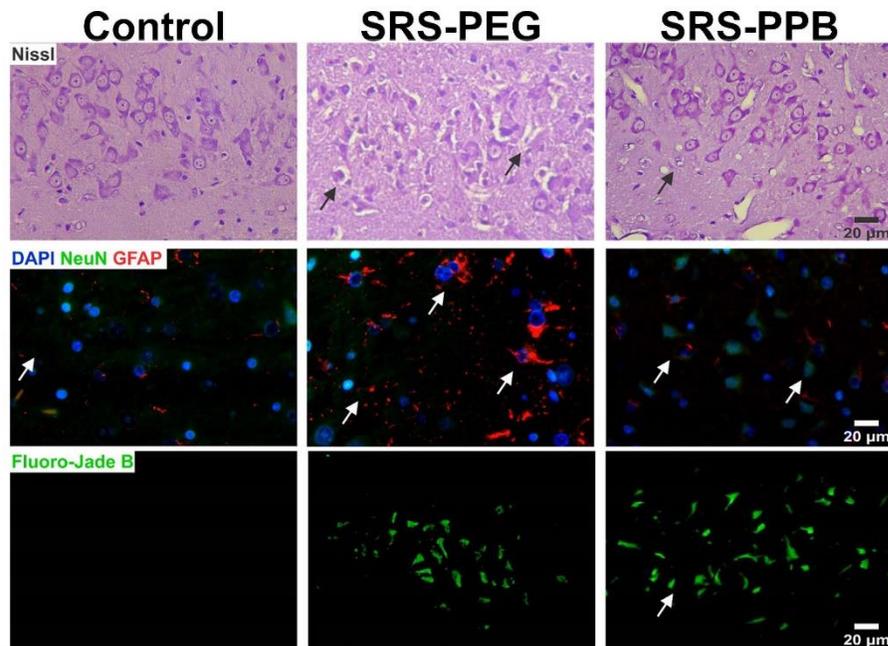


Fig. 8. Representative microphotographs of coronal sections of hilus at the dorsal hippocampus of rats in the control, SRS-PEG, and SRS-PPB groups during the chronic epileptic period PPB. The sections were stained with Nissl (upper panels), NeuN-DAPI-GFAP (middle panels) and Fluoro-Jade B (bottom panels). Note the decreased neuronal density and increased astroglial staining (GFAP expression) in the SRS-PEG group. These changes were less evident in the SRS-PPB group.

the decreased release of glutamate and some of the neuroprotective effects that were observed in this study.

At present, the interaction between PPB and Na^+ channels is unknown, but it may share some mechanisms with phenytoin, a drug that induces anticonvulsant and neuroprotective effects by blocking Na^+ channels (Raftopoulos et al., 2016). Studies indicate that hydrogen bonds are established between the carbonyl and amino groups of phenytoin and the protein structure of the Na^+ channel (Poupaert et al., 1984). Concerning the molecular structure of PPB, the presence of free electrons in the ester group (Cashman and Warshaw, 2005) may allow the formation of hydrogen bonds with Na^+ channels.

During pilocarpine-induced SE, the hippocampus presents epileptiform activity and high-frequency oscillations (90–250 Hz) that persist despite DZP administration (Karunakaran et al., 2012; Santana-Gómez et al., 2015). Our results indicate that the administration of DZP in combination with PPB decreases the epileptiform activity and high-frequency oscillations associated with SE more effectively. Similarly, drugs with anesthetic effects (ketamine, thiopental, and morphine) reduce the high-frequency brain activity that is evoked by chemical or electrical stimulation (Faulkner et al., 1998; Whittington et al., 2000). However, Fourier analysis revealed that the combination of DZP and PPB increased the potency of low-frequency oscillations (0.1–30 Hz), an effect that has been associated with reduced epileptiform activity. These results support the notion that the high prevalence of oscillations at low frequencies can be associated with antiepileptic effects (La Grutta and Sabatino, 1988; Miller et al., 1994).

PPB is used as a preservative in some oral pharmaceutical forms of antiepileptic drugs, such as levetiracetam (Keppra), carbamazepine (Tegretol), oxcarbazepine (Trileptal), DZP (Actavis, UK LTD) and gabapentin (Rosemont Pharmaceuticals Limited) (<https://www.medicines.org.uk/emc/>). Considering that PPB induces inhibitory effects in the CNS (Matthews et al., 1956; Lara-Valderrábano et al., 2016), it is possible to suggest that its combination with antiepileptic drugs may result in a more effective therapy to reduce seizure activity. However, additional experiments are necessary to support this hypothesis.

The results obtained revealed that the acute administration of PPB induces neuroprotective effects in DG, hilus, CA1 and CA3, 24 h after SE. In contrast, subchronic administration of PPB during the post-SE period did not prevent the occurrence of SRS or the cell loss in hilus, CA1, and CA3 through the chronic epileptic period. These results indicate that the subchronic treatment of PPB during the post-SE period was ineffective at preventing the epileptogenic process and neuronal damage in these brain areas. Similarly, cell loss is also found after the subchronic administration of antiepileptic drugs such as vigabatrin, levetiracetam, topiramate and DZP in animals that undergo SE (André et al., 2001; Brandt et al., 2007; François et al., 2006). Further experiments are necessary to determine whether antiepileptogenic and neuroprotective effects can be achieved using PPB at higher doses or with longer treatments.

DG plays a role as a *gate* by reducing seizure propagation from the hippocampus to other brain areas (Cohen et al., 2003; Krook-Magnuson et al., 2015). We found that animals receiving chronic PPB administration after SE presented a decrease in astroglial staining.

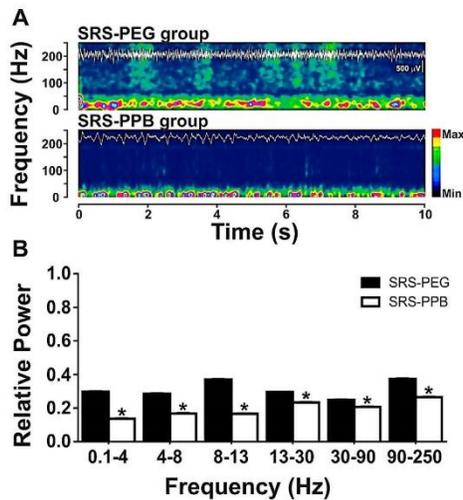


Fig. 9. (A) Time–frequency representation of the power spectrum (0.1–250 Hz) of the hippocampal electrographic activity during the interictal period of animals with SRS that were treated subchronically with vehicle or PPB (the SRS-PEG and SRS-PPB groups, respectively). The notations are as described for Fig. 3. Note an increase in the electrical activity at all evaluated frequencies for the SRS-PEG group. These changes were less evident in the recordings obtained for animals in the SRS-PPB group. (B) Representative relative power spectral analysis of the hippocampal electrical activity during the interictal period. Note that the relative power activity obtained for the SRS-PPB group (black bars) was significantly lower than that obtained for the SRS-PEG group (open bars). Values represent means \pm standard errors, * $p < 0.001$.

glutamate release and neuronal excitability during the chronic epileptic period, conditions that have been associated with neuroprotective effects that are restricted to DG. Parabens, including PPB, produce weak estrogenic effects (30,000-fold less potent than 17 β -estradiol) (Blair et al., 2000; Routledge et al., 1998). The administration of 17 β -estradiol induces neuroprotection in both SE and ischemic animal models (Dubal et al., 1998; Simpkins et al., 1997; Velísková et al., 2000). This effect is associated with antioxidant mechanisms (Behl et al., 1997), the blockage of Ca^{2+} voltage-dependent channels (Mermelstein et al., 1996), reductions in the activation of NMDA receptors (Weaver et al., 1997) and the enhanced binding of γ -aminobutyric acid (GABA) to GABA_A receptors (Maggi and Perez, 1986). It is possible to suggest that the high benzodiazepine/GABA_A receptor binding that is induced in DG during the epileptogenic process (Kamphuis et al., 1995; Rocha and Ondarza-Rovira, 1999) facilitates the neuroprotection mediated by PPB. Indeed, this would explain the lower seizure frequency and neuronal excitability in animals with SRS. Further studies are necessary to support this idea.

Studies have revealed that the estrogenic activity of parabens induces several important side effects (Byford et al., 2002; Darbre et al., 2003; Okubo et al., 2001) that may restrict their use as pharmacological neuroprotectants. These side effects include the development of breast cancer (Darbre and Harvey, 2014), the activation of genes and transductional mechanisms that are associated with cell proliferation (Wróbel and Gregoraszczyk, 2014a,b, 2015) and uterotrophic alterations (Lemini et al., 2004). Before proposing the administration of PPB for use as a new neuroprotective treatment, it is important to test for any

neurotoxic effects; ongoing experiments in our laboratory using Fluoro-Jade B staining indicate that a daily PPB dose from 30 to 150 mg/kg, i.p., for 6 days does not induce neuronal damage. However, additional experiments are essential to establish safe conditions for chronic PPB administration.

5. Conclusion

PPB has a wide margin of security that allows its administration with a low probability of inducing toxic effects at low doses. In addition, the pharmacokinetic aspects of PPB are widely known (Soni et al., 2001).

The results obtained in this study suggest that the systemic administration of PPB could represent an appropriate therapeutic strategy to reduce the neuronal damage and neuronal excitability induced by SE and SRS. Future studies must be conducted to investigate if the PPB associated with sub-effective doses of antiepileptic drugs represent a novel pharmacological strategy to reduce the consequences of SE and epilepsy.

Conflict of interest

Dr. Santana-Gómez and Dr. Rocha report grants from National Council for Science and Technology of Mexico (CONACyT) and UC-MEXUS, during the conduct of the study. Dr. Rocha, Dr. Santana-Gómez, Dr. Orozco-Suárez, Dr. Talevi, and Dr. Bruno-Blanch have a patent WO 2015/049608 A1 pending. Dr. Magdalena-Madrigal and Dr. Fernández-Mas have nothing to disclose.

Acknowledgments

We thank Franca Carmona for her technical assistance and the National Council for Sciences and Technology of Mexico (CONACyT) grant 220365, scholarship 243430 and bilateral project 189545) and UC Mexus-CONACyT collaborative grant.

References

- André, V., Ferrandon, A., Marescaux, C., Nehlig, A., 2001. Vigabatrin protects against hippocampal damage but is not antiepileptogenic in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 47, 99–117. doi:10.1016/S0920-1211(01)00299-6.
- Behl, C., Skutella, T., Lezoualc'h, F., Post, A., Widmann, M., Newton, C.J., Holsboer, F., 1997. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol. Pharmacol.* 51, 535–541. doi:10.1124/mol.51.4.535.
- Besio, W., Cuellar-Herrera, M., Luna-Munguía, H., Orozco-Suárez, S., Rocha, L., 2013. Effects of transcranial focal electrical stimulation alone and associated with a sub-effective dose of diazepam on pilocarpine-induced status epilepticus and subsequent neuronal damage in rats. *Epilepsy Behav.* 28, 432–436. doi:10.1016/j.yebeh.2013.06.021.
- Blair, R.M., Fang, H., Brantham, W.S., Hass, B.S., Dial, S.L., Moland, C.L., Tong, W., Shi, L., Perkins, R., Sheehan, D.M., 2000. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicol. Sci.* 54, 138–153. doi:10.1093/toxsci/54.1.138.
- Brandt, C., Glien, M., Gastens, A.M., Fedorowicz, M., Bethmann, K., Volk, H.A., Potschka, H., Löscher, W., 2007. Prophylactic treatment with levetiracetam after status epilepticus: lack of effect on epileptogenesis, neuronal damage, and behavioral alterations in rats. *Neuropharmacology* 53, 207–221. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.05.001.
- Byford, J., Shaw, L., Drew, M.G., Pope, G., Sauer, M., Darbre, P., 2002. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80, 49–60. doi:10.1016/S0960-0760(01)00174-1.
- Catabresi, P., Cupini, L.M., Centonze, D., Pisani, F., Bernardi, G., 2003. Antiepileptic drugs as a possible neuroprotective strategy in brain ischemia. *Ann. Neurol.* 53, 693–702. doi:10.1002/ana.10603.
- Cashman, A.L., Warshaw, E.M., 2005. Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties. *Dermatitis* 16, 57–66. doi:10.2310/6620.2005.05008.
- Cohen, A.S., Lin, D.D., Quirk, G.L., Coulter, D.A., 2003. Dentate granule cell GABA A receptors in epileptic hippocampus: enhanced synaptic efficacy and altered pharmacology. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1607–1616. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02597.x.

- Cunha, A.O.S., Mortari, M.R., Liberato, J.L., Dos Santos, W.F., 2009. Neuroprotective effects of diazepam, carbamazepine, phenytoin and ketamine after pilocarpine-induced status epilepticus. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 104, 470–477. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00403.x>.
- Darbre, P.D., Byford, J.R., Shaw, L.E., Hall, S., Coldham, N.G., Pope, G.S., Sauer, M.J., 2003. Oestrogenic activity of benzylparaben. *J. Appl. Toxicol.* 23, 43–51. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/jat.886>.
- Darbre, P.D., Harvey, P.W., 2014. Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status. *J. Appl. Toxicol.* 34, 925–938. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/jat.3027>.
- Dubal, D.B., Kashon, M.L., Pettigrew, L.C., Ren, J.M., Finklestein, S.P., Rau, S.W., Wise, P.M., 1998. Estradiol protects against ischemic injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 1253–1258. doi: <http://dx.doi.org/10.1097/00004647-199811000-00012>.
- During, M.J., Spencer, D.D., 1993. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet* 341, 1607–1610. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90754-5](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(93)90754-5).
- Electronic Medicines Compendium (eMC) UK, 1999. <https://www.medicines.org.uk/emc/> (accessed 29.05.2016).
- Faulkner, H.J., Traub, R.D., Whittington, M.A., 1998. Disruption of synchronous gamma oscillations in the rat hippocampal slice: a common mechanism of anaesthetic drug action. *Br. J. Pharmacol.* 125, 483–492. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0702113>.
- Fernández-Mas, R., Valdés-Cruz, A., Martínez-Cervantes, A., Magdaleno-Madrugal, V.M., Almazán-Alvarado, S., Martínez-Vargas, D., Fernández-Guardiola, A., 1998. Visualización gráfica de las transiciones de las fases del sueño en el hombre: Métodos de representación tridimensional. *Salud Ment.* 21, 27–32.
- François, J., Germe, K., Ferrandon, A., Koning, E., Nehlig, A., 2011. Carisbamate may improve disease-modifying effects in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neuropharmacology* 61, 313–328. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.04.018>.
- François, J., Koning, E., Ferrandon, A., Nehlig, A., 2006. The combination of topiramate and diazepam is partially neuroprotective in the hippocampus but not antiepileptogenic in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 72, 147–163. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2006.07.014>.
- Fujikawa, D.G., 1996. The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res.* 725, 11–22. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)02033-X](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(96)02033-X).
- Fujikawa, D.G., 1995. Neuroprotective effect of ketamine administered after status epilepticus onset. *Epilepsia* 36, 186–195. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1195.1995.tb00979.x>.
- Isokawa, M., Mello, L.E., 1991. NMDA receptor-mediated excitability in dendritically deformed dentate granule cells in pilocarpine-treated rats. *Neurosci. Lett.* 129, 69–73. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0304-394X\(91\)90722-6](http://dx.doi.org/10.1016/0304-394X(91)90722-6).
- Ji, X., Xu, Z., Criswell, H.E., Boysen, P.G., 2004. Propyl paraben inhibits voltage-dependent sodium channels and protects cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury. *Life Sci.* 74, 3043–3052. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2003.11.007>.
- Jones, B.F.S., Thigpen, D., Morrison, J.L., Richardson, A.P., 1956. p-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives III. The physiological disposition of p-hydroxybenzoic acid and its esters. *J. Am. Pharm. Assoc.* 45, 268–273. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.3030450421>.
- Kamphuis, W., De Rijk, T.C., Silva, F.H.L., 1995. Expression of GABA A receptor subunit mRNAs in hippocampal pyramidal and granular neurons in the kindling model of epileptogenesis: an in situ hybridization study. *Mol. Brain Res.* 31, 33–47. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00022-K](http://dx.doi.org/10.1016/0169-328X(95)00022-K).
- Karunakaran, S., Grasse, D.W., Moxon, K.A., 2012. Changes in network dynamics during status epilepticus. *Exp. Neurol.* 234, 454–465. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.01.020>.
- Kendrick, K.M., Keverne, E.B., Chapman, C., Baldwin, B.A., 1988. Microdialysis measurement of oxytocin, aspartate, gamma-aminobutyric acid and glutamate release from the olfactory bulb of the sheep during vaginocervical stimulation. *Brain Res.* 442, 171–174. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)91447-3](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(88)91447-3).
- Kobow, K., Auvin, S., Jensen, F., Löscher, W., Mody, I., Potschka, H., Prince, D., Sierra, A., Simonato, M., Pitkänen, A., Nehlig, A., Rho, J.M., 2012. Finding a better drug for epilepsy: antiepileptogenesis targets. *Epilepsia* 53, 1868–1876. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03716.x>.
- Krook-Magnuson, E., Armstrong, C., Bui, A., Lew, S., Ojalá, M., Soltesz, I., 2015. In vivo evaluation of the dentate gate theory in epilepsy. *J. Physiol.* 593, 2379–2388. doi: <http://dx.doi.org/10.1113/jp270056>.
- La Grutta, V., Sabatino, M., 1988. Focal hippocampal epilepsy: effect of caudate stimulation. *Exp. Neurol.* 99, 38–49. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4886\(88\)90125-2](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4886(88)90125-2).
- Lara-Valderrábano, L., Rocha, L., Galván, E.J., 2016. Propylparaben reduces the excitability of hippocampal neurons by blocking sodium channels. *Neurotoxicology* 57, 183–193. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2016.09.019>.
- Lemini, C., Hernández, A., Jaimez, R., Franco, V., Avila, M.E., Castell, A., 2004. Morphometric analysis of mice uteri treated with the preservatives methyl, ethyl, propyl, and butylparaben. *Toxicol. Ind. Health* 20, 123–132. doi: <http://dx.doi.org/10.1191/0748233704th2020a>.
- Luna-Munguia, H., Orozco-Suarez, S., Rocha, L., 2011. Effects of high-frequency electrical stimulation and R-verapamil on seizure susceptibility and glutamate and GABA release in a model of phenytoin-resistant seizures. *Neuropharmacology* 61, 807–814. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.05.027>.
- Maggi, A., Perez, J., 1986. Estrogen-induced up-regulation of γ -aminobutyric acid receptors in the CNS of rodents. *J. Neurochem.* 47, 1793–1797. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.1986.tb13090.x>.
- Maidment, N.T., Brumbaugh, D.R., Rudolph, V.D., Erdelyi, E., Evans, C.J., 1989. Microdialysis of extracellular endogenous opioid peptides from the rat brain in vivo. *Neuroscience* 33, 549–557. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90407-7](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(89)90407-7).
- Matthews, C., Davidson, J., Bauer, E., Morrison, J.L., Richardson, A.P., 1956. p-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives. II. Acute and chronic toxicity in dogs, rats, and mice. *J. Am. Pharm. Assoc. Am. Pharm. Assoc. (Baltim.)* 45, 260–267. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.3030450420>.
- Mermetstein, P.G., Becker, J.B., Surmeier, D.J., 1996. Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *J. Neurosci.* 16, 595–604.
- Miller, J.W., Turner, G.M., Gray, B.C., 1994. Anticonvulsant effects of the experimental induction of hippocampal theta activity. *Epilepsy Res.* 18, 195–204. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0920-1211\(94\)90040-X](http://dx.doi.org/10.1016/0920-1211(94)90040-X).
- Okubo, T., Yokoyama, Y., Kano, K., Kano, I., 2001. ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER α and PR. *Food Chem. Toxicol.* 39, 1225–1232. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915\(01\)00073-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915(01)00073-4).
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Australia.
- Pitkänen, A., Lukasiuk, K., 2011. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol.* 10, 173–186. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70310-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70310-0).
- Poupaert, J.H., Vandervorst, D., Guiot, P., Moustafa, M.M., Dumont, P., 1984. Structure-activity relationships of phenytoin-like anticonvulsant drugs. *J. Med. Chem.* 27, 76–78. doi: <http://dx.doi.org/10.1021/jm00367a015>.
- Racine, R.J., 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation: I. After-discharge threshold. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32, 269–279. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90176-9](http://dx.doi.org/10.1016/0013-4694(72)90176-9).
- Raftopoulos, R., Hickman, S.J., Toosy, A., Sharrack, B., Mallik, S., Paling, D., Altmann, D.R., Yiannakas, M.C., Malladi, P., Sheridan, R., Sarrigiannis, P.G., Hoggard, N., Koltzenburg, M., Wheeler-Kingshott, C.A.M.G., Schmierer, K., Giovannoni, G., Miller, D.H., Kapoor, R., 2016. Phenytoin for neuroprotection in patients with acute optic neuritis: a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol.* 15, 259–269. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00004-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00004-1).
- Roch, C., Leroy, C., Nehlig, A., Namer, I.J., 2002. Magnetic resonance imaging in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in adult rats. *Epilepsia* 43, 325–335. doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1528-1157.2002.11301.x>.
- Rocha, L., Ondarza-Rovira, R., 1999. Characterization of benzodiazepine receptor binding following kainic acid administration: an autoradiography study in rats. *Neurosci. Lett.* 262, 211–214. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00080-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00080-4).
- Rogawski, M.A., Löscher, W., 2004. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 553–564. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1430>.
- Routledge, E.J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., Sumpter, J.P., 1998. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153, 12–19. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/taap.1998.8544>.
- Santana-Gómez, C.E., Alcántara-González, D., Luna-Munguia, H., Bañuelos-Cabrera, I., Magdaleno-Madrugal, V., Fernández-Mas, R., Besio, W., Rocha, L., 2015. Transcranial focal electrical stimulation reduces the convulsive expression and amino acid release in the hippocampus during pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Epilepsy Behav.* 49, 33–39. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.04.037>.
- Schmued, L.C., Albertson, C., Slikker Jr., W., 1997. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 751, 37–46. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01387-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01387-X).
- Simpkins, J.W., Rajakumar, G., Zhang, Y.Q., Simpkins, C.E., Greenwald, D., Yu, C.J., Bodor, N., Day, A.L., 1997. Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. *J. Neurosurg.* 87, 724–730. doi: <http://dx.doi.org/10.3171/jns.1997.87.5.0724>.
- Soni, M.G., Burdock, G.A., Taylor, S.L., Greenberg, N.A., 2001. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. *Food Chem. Toxicol.* 39, 513–532. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00162-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00162-9).
- Soukupova, M., Binasci, A., Falcicchia, C., Palma, E., Roncon, P., Zucchini, S., Simonato, M., 2015. Increased extracellular levels of glutamate in the hippocampus of chronically epileptic rats. *Neuroscience* 20, 246–253. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.013>.
- Talevi, A., Bellera, C.L., Castro, E.A., Bruno-Blanch, L.E., 2007. A successful virtual screening application: prediction of anticonvulsant activity in MES test of widely used pharmaceutical and food preservatives methylparaben and propylparaben. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 21, 527–538. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10822-007-9136-9>.
- Valdés-Cruz, A., Negrete-Díaz, J.V., Magdaleno-Madrugal, V.M., Martínez-Vargas, D., Fernández-Mas, R., Almazán-Alvarado, S., Torres-García, M.E., Flores, G., 2012. Electroencephalographic activity in neonatal ventral hippocampus lesion in adult rats. *Synapse* 66, 738–746. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/syn.21563>.
- Velisková, J., Velisek, L., Galanopoulou, A.S., Sperber, E.F., 2000. Neuroprotective effects of estrogens on hippocampal cells in adult female rats after status epilepticus. *Epilepsia* 41 (Suppl. 6), S30–S35. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb01553.x>.

- Wager, T.T., Hou, X., Verhoest, P.R., Villalobos, A., 2010. Moving beyond rules: the development of a central nervous system multiparameter optimization (CNS MPO) approach to enable alignment of drug like properties. *ACS Chem. Neurosci.* 1, 435–449. doi:<http://dx.doi.org/10.1021/cn100008c>.
- Weaver Jr., C.E., Park-Chung, M., Gibbs, T.T., Farb, D.H., 1997. 17 β -Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res.* 761, 338–341. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00449-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00449-6).
- West, M.J., Slomianka, L., Gundersen, H.J.G., 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.* 231, 482–497. doi:<http://dx.doi.org/10.1002/ar.1092310411>.
- Whittington, M.A., Faulkner, H.J., Doherty, H.C., Traub, R.D., 2000. Neuronal fast oscillations as a target site for psychoactive drugs. *Pharmacol. Ther.* 86, 171–190. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7258\(00\)00038-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7258(00)00038-3).
- Wróbel, A.M., Gregoraszczuk, E.L., 2015. Action of methyl-, propyl- and butylparaben on GPR30 gene and protein expression, cAMP levels and activation of ERK1/2 and PI3K/Akt signaling pathways in MCF-7 breast cancer cells and MCF-10A non-transformed breast epithelial cells. *Toxicol. Lett.* 238, 110–116. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.08.001>.
- Wróbel, A.M., Gregoraszczuk, E.L., 2014a. Actions of methyl-, propyl- and butylparaben on estrogen receptor- α and - β and the progesterone receptor in MCF-7 cancer cells and non-cancerous MCF-10A cells. *Toxicol. Lett.* 230, 375–381. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.08.012>.
- Wróbel, A.M., Gregoraszczuk, E.L., 2014b. Differential effect of methyl-, butyl- and propylparaben and 17 β -estradiol on selected cell cycle and apoptosis gene and protein expression in MCF-7 breast cancer cells and MCF-10A non-malignant cells. *J. Appl. Toxicol.* 34, 1041–1050. doi:<http://dx.doi.org/10.1002/jatL2978>.
- Xie, Y., Dengler, K., Zacharias, E., Willfert, B., Tegmeier, F., Gmöh, J., 1994. Effects of the sodium channel blocker tetrodotoxin (TTX) on cellular ion homeostasis in rat brain subjected to complete ischemia. *Brain Res.* 652, 216–224. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90230-5](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(94)90230-5).