



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

**“Estudio del efecto de la estimulación eléctrica focal transcraneal  
en la expresión de glicoproteína P durante el proceso de  
epileptogénesis”**

Tesis que presenta

**M. en C. Daniel Fonseca Barriendos**

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

**en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Directores de Tesis:

Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta

Dr. Alejandro Valdés Cruz



El presente trabajo de investigación se desarrolló bajo la dirección de la Doctora Luisa L. Rocha Arrieta y del Doctor Alejandro Valdés Cruz. El trabajo experimental se llevó a cabo en el laboratorio 8 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y en el laboratorio de Neurofisiología del Control y de la Regulación del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” (Proyecto NC123240.1), con el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) a través de la beca No. 489736.

## Agradecimientos

A la Dra. Luisa Rocha, por formarme durante estos 6 (largos) años. Siempre vio algo en mi que yo no podía ver.

Al Dr. Alejandro Valdés Cruz, que sin conocerme me recibió en su laboratorio y con el que, a pesar de la pandemia, pudimos sacar adelante todo el trabajo.

A mis sinodales, las Doctoras Claudia González, Mónica Lamas, Leticia Víquez y Sandra Orozco. Sus comentarios enriquecieron este trabajo a lo largo de estos 4 años.

A la Q.F.I. Francia del Carmen Carmona Cruz por seguir haciendo las mañanas más amenas y la compra de reactivos menos caótica. El laboratorio se caería sin ti.

Al laboratorio 8, los que van llegando, los que se fueron y los que volvieron. Todos dejan alguna enseñanza, desde pipetear hasta como elegir los colores de una presentación. Gracias a los habitantes de la covacha y a los foráneos del fondo del laboratorio.

A mi familia putativa, esos que no son, pero eliges. Grecia, Jesús, Christopher, Erick, Eduardo, José Luis, Angie y Saúl. Gracias por esos sábados donde solo íbamos a quejarnos de la vida y hacer corajes en catán. Hicieron estos 4 años mucho más llevaderos.

A mis abuelos, que siguen sin saber que hago, pero siempre apoyándome. No puedo imaginar estar aquí sin ustedes.

A mi madre, por la paciencia, el cariño y el apoyo brindado estos 4 + 28 años. Me ganaste en la carrera del Doctorado, pero estuvo divertido el intento.

A mi padre, que a pesar de la distancia siempre está presente con un mensaje o una llamada. A Rocío, Adrián y Miguel Ángel quienes hace muchos años se volvieron parte de la familia.

A Sebastián, sobran las palabras. No pude pedir mejor hermano. Espero estés orgulloso.

## Índice de figuras

Figura 1 Estructura de la GPP.....	1
Figura 2 Hipótesis de la hiperexcitabilidad neuronal mediada por GPP (modificado de Lazarowski et al., 2007).....	7
Figura 3 La sobreexpresión de GPP estaría asociada al incremento en la hiperexcitabilidad y aumento en la susceptibilidad a presentar crisis subsecuentes.....	8
Figura 4 Propagación del <i>kindling</i> eléctrico amigdalino.....	11
Figura 5 Esquema representativo del implante de electrodos.....	18
Figura 6 Determinación del UPD y KEA.....	19
Figura 7 Registro de la actividad epileptiforme inducida por el KEA.....	20
Figura 8 Esquema representativo del implante de electrodos para KEA y EFT.....	21
Figura 9 El campo eléctrico de la EFT penetra a estructuras subcorticales en el gato..	22
Figura 10 Diseño experimental para evaluar la expresión de GPP en áreas cerebrales asociadas con la propagación de las crisis convulsivas en diferentes fases del KEA..	24
Figura 11 Diseño experimental para evaluar la asociación entre el efecto antiepileptogénico de la EFT y la concentración proteica de GPP en áreas cerebrales involucradas en la propagación de las crisis convulsivas.....	28
Figura 12 Aumento progresivo de las fases asociadas al proceso de epileptogénesis inducida por KEA.....	32
Figura 13 Aumento progresivo en la duración de la posdescarga y frecuencia de espigas durante el proceso de epileptogénesis inducida por KEA.....	33
Figura 14 Aumento progresivo en la expresión proteica de GPP durante la epileptogénesis inducida por KEA.....	34
Figura 15 Gráfica que muestra la correlación positiva entre la expresión relativa de GPP en hipocampo contralateral y la frecuencia de espigas en amígdala durante las crisis fase V del grupo <i>kindled</i> .....	35

Figura 16 Gráfica que representa el efecto de la EFT aplicada inmediatamente después de cada estímulo tipo <i>kindling</i> . .....	36
Figura 17 Trazos representativos de los grupos <i>kindled</i> , K+EFT y EFT.....	37
Figura 18 Concentración proteica de GPP en hipocampo y corteza frontal ipsi- y contralateral.....	39
Figura 19 Mecanismos moleculares presentes durante la actividad convulsiva asociados a la sobreexpresión de GPP.....	44
Figura 20 Mecanismo propuesto en el efecto antiepileptogénico de la EFT.....	51

## Índice de tablas

<b>Tabla 1 Fármacos susceptibles al eflujo por glicoproteína P.....</b>	<b>2</b>
<b>Tabla 2 Fármacos con efecto antiepileptogénico en el modelo de KEA .....</b>	<b>12</b>
<b>Tabla 3 Escala de Racine.....</b>	<b>19</b>

## Abreviaciones

<sup>18</sup> F-FDG	<sup>18</sup> -Fluor-Fluorodeoxiglucosa
3MP	Ácido 3-mercaptopropiónico
ABC	<i>ATP Binding cassettes</i>
BHE	Barrera hematoencefálica
COX-2	Ciclooxigenasa tipo 2
ECD	Estimulación por corriente directa
ECT	Electrodo concéntrico tripolar
EFT	Estimulación eléctrica focal transcraneal
ELT	Epilepsia del lóbulo temporal
EMT	Estimulación magnética transcraneal
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GPP	Glicoproteína P
GSK-3	Glucógeno sintasa cinasa-3
HIF-1 $\alpha$	Factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$
IFN- $\gamma$	Interferón- $\gamma$

IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina-6
KEA	<i>Kindling</i> eléctrico amigdalino
LFS	Estimulación de baja frecuencia
LTP	Potenciación a largo plazo
MDR-1	Multidrug resistance type 1
miR	microRNA
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa b
NMDA	N-metil-D-aspartato
PTZ	Pentilenetetrazol
RNAInc	RNA largo no codificante
SNC	Sistema nervioso central
SVA2	Glicoproteína de vesícula sináptica A2
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
UPD	Umbral posdescarga
VGAC	Canales de Cl <sup>-</sup> dependientes de volumen
VGSC	Canal de sodio dependiente de voltaje
VTA	Volumen de tejido activado



## Tabla de contenido

Índice de figuras.....	III
Índice de tablas.....	V
Abreviaciones.....	VI
Resumen.....	X
Abstract.....	XII
1. Introducción.....	1
1.1. Glicoproteína P.....	1
1.2. Sobreexpresión de GPP en la epilepsia y en modelos de crisis convulsivas.....	3
1.3. GPP e hiperexcitabilidad celular.....	6
1.4. Epileptogénesis.....	9
1.5. Neuromodulación y estimulación eléctrica focal transcraneal.....	12
1.6. Justificación.....	15
2. Hipótesis.....	15
3. Objetivos generales.....	16
3.1. Objetivos específicos.....	16
4. Metodología.....	16
4.1. Animales.....	16
4.2. Cirugía e implante de electrodos.....	17
4.3. UPD y KEA.....	18
4.4. Registros electroencefalográficos y actividad epileptiforme.....	20
4.5. Estimulación eléctrica focal transcraneal.....	21
4.6. Experimento 1: Evaluar la expresión de GPP en áreas cerebrales específicas durante las diferentes fases del KEA.....	22
4.6.1. Grupos experimentales.....	23
4.6.2. Cuantificación de GPP mediante Western blot.....	24
4.7. Experimento 2: Determinar si la aplicación de EFT diaria modifica la progresión del KEA en rata.....	26
4.7.1. Grupos experimentales.....	26
4.8. Experimento 3: Analizar el efecto de la EFT diaria durante el KEA en la concentración proteica de GPP en áreas cerebrales específicas durante el KEA.....	27
4.8.1. Grupos experimentales.....	27

4.8.2. Ensayo de Elisa .....	29
5. Resultados .....	30
5.1. La epileptogénesis inducida por KEA se asoció con aumento en la expresión de GPP en áreas cerebrales involucradas con la propagación de las crisis convulsivas .....	30
5.2. La EFT aplicada inmediatamente después de cada estímulo tipo KEA evita la propagación de las crisis convulsivas .....	35
5.3. La EFT evita el aumento en la concentración proteica de GPP durante la epileptogénesis inducida por KEA.....	37
6. Discusión .....	40
6.1. Epileptogénesis inducida por KEA.....	40
6.2. La epileptogénesis inducida por KEA se asoció con aumento en la expresión de GPP en áreas cerebrales involucradas con la propagación de las crisis convulsivas .....	41
6.2.1. Mecanismos moleculares asociados a la sobreexpresión de GPP .....	42
6.2.2. Mecanismos epigenéticos asociados a la sobreexpresión de GPP .....	44
6.2.3. Sobreexpresión de GPP durante la adquisición del KEA: propagación de la actividad epileptiforme.....	45
6.2.4. Hiperexcitabilidad asociada a la expresión neuronal de GPP.....	47
6.3. La EFT aplicada inmediatamente después de cada estímulo KEA evita la propagación de las crisis convulsivas.....	48
6.3.1. Propiedades biofísicas de la EFT .....	48
6.3.2. Mecanismo propuesto en el efecto antiepileptogénico de la EFT .....	50
6.3.3. Ventana de tiempo y otros tipos de neuromodulación .....	52
6.4. La EFT evita el aumento de la proteína GPP durante la epileptogénesis inducida por KEA	53
7. Conclusiones.....	56
8. Perspectivas.....	57
9. Referencias .....	59

## Resumen

La epileptogénesis es el proceso de adquisición y extensión de tejido hiperexcitable. Se ha sugerido que la sobreexpresión de glicoproteína P (GPP) puede mediar la hiperexcitabilidad neuronal y favorecer la epileptogénesis. Por otro lado, la estimulación eléctrica focal transcraneal (EFT) es una técnica de neuromodulación no invasiva que retrasa la generalización de las crisis convulsivas en un modelo de epileptogénesis y evita la sobreexpresión de GPP después de una crisis convulsiva generalizada. En este estudio primero se evaluó la expresión de GPP en áreas cerebrales involucradas con la propagación de las crisis convulsivas en el modelo de epileptogénesis inducida por *kindling* eléctrico amigdalino (KEA). Después, se determinó si el efecto antiepileptogénico de la EFT está asociado con evitar la sobreexpresión de GPP en áreas cerebrales involucradas con la propagación de las crisis convulsivas en el modelo de epileptogénesis inducida por KEA.

Para el primer objetivo se utilizaron ratas Wistar macho previamente implantadas en la amígdala basolateral derecha. Estas ratas fueron estimuladas diariamente para inducir el KEA. La expresión de GPP fue evaluada en distintas fases de la epileptogénesis en hipocampo y corteza frontal, áreas cerebrales importantes para la propagación de las crisis. El grupo de fase I presentó un incremento del 85% en la expresión de GPP en hipocampo ipsilateral al sitio de estimulación. El grupo de fase III mostró un incremento en la expresión de GPP del 58% y 57% en hipocampo ipsi- y contralateral, respectivamente. El grupo *kindled* mostró sobreexpresión de GPP en hipocampo ipsi- y contralateral (92% y 90%, respectivamente), y en corteza frontal ipsi- y contralateral (93% y 143%, respectivamente).

Para el segundo objetivo, se utilizaron ratas Wistar macho previamente implantadas en amígdala basolateral derecha y a las cuales se les implantó un electrodo para EFT sobre la línea media, entre bregma y lambda. La EFT fue aplicada diariamente después de cada estímulo tipo *kindling* durante 20 días y al final del protocolo se evaluó la concentración proteica de GPP en corteza frontal e hipocampo. No se encontraron cambios en la concentración proteica de GPP del grupo EFT en ninguna estructura

analizada. El grupo *kindled* mostró un incremento del 132% y 138% en la concentración de GPP en hipocampo ipsi- y contralateral, respectivamente; y en corteza frontal de 51% y 92%, ipsi- y contralateral, respectivamente. El grupo *kindled* + EFT no progresó en el modelo de KEA y no se encontraron cambios en la concentración proteica de GPP en ninguna estructura.

Nuestros resultados muestran que la progresión de la epileptogénesis inducida por el KEA está asociada con aumento en la expresión de GPP. Estos cambios son dependientes de la estructura cerebral involucrada y de la severidad de las crisis convulsivas. La sobreexpresión de GPP inducida por el KEA podría facilitar la excitabilidad neuronal y, por lo tanto, favorecer la epileptogénesis. La GPP podría ser un blanco terapéutico novedoso para evitar la epileptogénesis. En línea con lo anterior, la EFT inhibió la sobreexpresión de GPP y evitó la propagación de las crisis convulsivas.

Una limitación importante de este estudio es que no se realizó la evaluación de la expresión neuronal de GPP en las distintas condiciones experimentales. Estudios futuros deberán ser realizados para determinar la relación entre la sobreexpresión de GPP y la hiperexcitabilidad neuronal durante la epileptogénesis.

## Abstract

Recent evidence suggests that P-glycoprotein (GPP) overexpression mediates hyperexcitability and is associated with epileptogenesis. Transcranial focal electrical stimulation (EFT) delays epileptogenesis and inhibits P-gp overexpression after a generalized seizure. Here, first we measured GPP expression during epileptogenesis and second, we assessed if EFT antiepileptogenic effect was related with GPP overexpression avoidance.

Male Wistar rats were implanted in right basolateral amygdala and stimulated daily for electrical amygdala kindling (KEA), GPP expression was assessed during epileptogenesis in relevant brain areas. Stage I group showed 85% increase in GPP ipsilateral hippocampus ( $p < 0.001$ ). Stage III group presented 58% and 57% increase in GPP in both hippocampi ( $p < 0.05$ ). Kindled group had 92% and 90% increase in GPP in both hippocampi ( $p < 0.01$ ), and 93% and 143% increase in both neocortices ( $p < 0.01$ ). For the second experiment, EFT was administrated daily after each KEA stimulation for 20 days and GPP concentration was assessed. No changes were found in the EFT group ( $p > 0.05$ ). Kindled group showed 132% and 138% increase in GPP in both hippocampi ( $p < 0.001$ ) and 51% and 92% increase in both cortices ( $p < 0.001$ ). Kindled + EFT group presented no changes ( $p > 0.05$ ).

Our experiments revealed that progression of KEA is associated with increased P-gp expression. These changes are structure-specific and dependent on seizure severity. KEA-induced P-gp overexpression would be associated with neuronal hyperexcitability and thus, epileptogenesis. GPP could be a novel therapeutical target to avoid epileptogenesis. In accordance with this, TFS inhibited GPP overexpression and interfered with KEA. An important limitation of the present study is that GPP neuronal expression was not evaluated under the different experimental conditions. Future studies should be carried out to determine GPP neuronal overexpression in hyperexcitable networks during epileptogenesis. The EFT-induced lessening of GPP overexpression could be a novel therapeutical strategy to avoid epileptogenesis in high-risk patients.

# 1. Introducción

## 1.1. Glicoproteína P

La glicoproteína P (GPP) es una proteína transmembranal de 170 kDa que forma parte de la superfamilia de transportadores ABC (*ATP binding cassettes*) y es producto del gen MDR-1 (*Multidrug resistance type 1*) (Figura 1).

En situaciones fisiológicas, la expresión de GPP se limita a órganos y tejidos con funciones excretoras y a células de la barrera hematoencefálica (Cordon-Cardo et al., 1989). Estos datos sugieren que la GPP posee un papel importante en la protección del organismo promoviendo el transporte de sustancias.

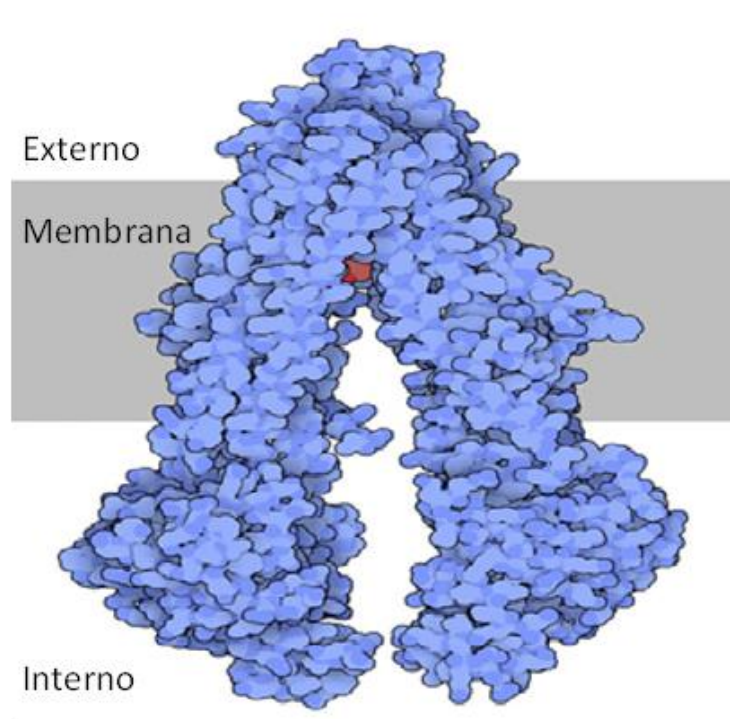


Figura 1 Estructura de la GPP. La GPP es una de las bombas moleculares más comunes en los mamíferos. Al activarse, la GPP cambia su conformación abriendo el asa al exterior, extruyendo la molécula capturada. La membrana celular se representa de forma esquemática en color gris (Modificado de Goodsell, 2010).

En el sistema nervioso central (SNC), la GPP se expresa en el lado luminal de las células endoteliales que forman la barrera hematoencefálica (BHE) (Beaulieu et al., 1997; Cordon-Cardo et al., 1989), en los procesos astrocíticos presentes en el lado abluminal (Golden & Pardridge, 1999) y en el epitelio de los plexos coroideos (Rao et al., 1999).

Entre los fármacos transportados por la GPP encontramos diversas sustancias que no comparten estructura química o mecanismo de acción (Tabla 1). En estos fármacos podemos destacar los antineoplásicos y fármacos anticrisis por su relevancia terapéutica.

**Tabla 1 Fármacos susceptibles al transporte por glicoproteína P**

<b>Uso</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Autor</b>
Antirretroviral	Indinavir	Inhibidor de proteasa viral	(Kim et al., 1998)
	Saquinavir		
	Nelfinavir		
Antihelmíntico	Ivermectina	Apertura de canales de cloro	(Schinkel et al., 1994)
Antineoplásico	Vinblastina	Antimitótico	(Schinkel et al., 1994)
	Etopósido	Inhibición de la síntesis de ADN	(Schinkel et al., 1996)
Antiarrítmico	Digoxina	Inhibición de ATPasa	(Lee et al., 2001; Schinkel et al., 1995)
Corticoesteroide	Dexametasona	Glucocorticoide sintético	(Schinkel et al., 1996)
Antiemético	Ondansetrón	Agonista de receptores 5-HT3	(Schinkel et al., 1996)
	Domperidona	Antagonista de receptores D2	
Antidiarreico	Loperamida	Agonista $\mu$ -opioide	(Schinkel et al., 1996)
Anticrisis	Fenitoína	Bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje	(Potschka & Löscher, 2001; Tishler et al., 1995)

	Fenobarbital	Agonista de receptores GABA <sub>A</sub>	(Potschka et al., 2002)
	Lamotrigina	Bloqueo de canales de sodio dependientes de voltaje	
	Felbamato	Inhibición de canales de calcio y de sodio dependientes de voltaje	
	Carbamazepina	Inhibición de los canales de sodio dependientes de voltaje	(Potschka et al., 2001)

GABA<sub>A</sub>: Receptor de ácido  $\gamma$ -aminobutírico tipo a

## 1.2. Sobreexpresión de GPP en la epilepsia y en modelos de crisis convulsivas

La epilepsia es uno de los padecimientos neurológicos más frecuentes, pues afecta aproximadamente a 50 millones de personas en el mundo (World Health Organization, 2019). Esta patología se caracteriza por la predisposición a presentar crisis epilépticas espontáneas y recurrentes que pueden ser focales (se originan en una región) o generalizadas (abarcando ambos hemisferios) (Potschka et al., 2001). Además de ser muy frecuente, la epilepsia representa un reto terapéutico pues se estima que 1 de cada 3 pacientes padecen epilepsia farmacorresistente pues no presentan mejoría a pesar del uso adecuado de fármacos anticrisis (Regesta & Tanganelli, 1999).

En patologías neoplásicas, la sobreexpresión de GPP ha sido asociada al fracaso terapéutico de los tratamientos (revisado por Karthika et al., 2022). Con base en estos antecedentes, diversos autores evaluaron si existía relación entre la sobreexpresión de GPP y la farmacorresistencia en epilepsia. Tishler y colaboradores reportaron que existe sobreexpresión cerebral de GPP en tejido resecado de pacientes con epilepsia farmacorresistente. Los autores sugirieron que el fracaso terapéutico se debía a la extrusión de los fármacos anticrisis (Tishler et al., 1995). La sobreexpresión cerebral de GPP ha sido reportada por otros autores tanto en tejido humano como en modelos



animales de crisis convulsivas farmacorresistentes y epilepsia farmacorresistente (Aronica et al., 2004, 2012; Enrique et al., 2017; Feldmann et al., 2013; Fonseca-Barriendos et al., 2022; Löscher & Potschka, 2002, 2005; Marchi et al., 2004; Pérez-Pérez et al., 2021; Potschka & Löscher, 2001; Seegers et al., 2002b; Sisodiya et al., 2002; Vega-García et al., 2021). Además de la expresión, se ha evaluado la funcionalidad de la GPP en modelos animales. Potschka y colaboradores reportaron que la GPP mediaba la acumulación en parénquima cerebral de fenobarbital, lamotrigina y felbamato (Potschka et al., 2002). Rizzi y colaboradores reportaron que el ratón *knock out* de GPP permitía la acumulación cerebral de fenitoína y carbamazepina (Rizzi et al., 2002). En línea con estos hallazgos, van Vliet y colaboradores reportaron que inhibir la sobreexpresión de GPP en ratas con crisis convulsivas espontáneas aumenta la acumulación de fenitoína en parénquima cerebral (van Vliet et al., 2010). De forma similar, Luna-Munguia y colaboradores reportaron que la perfusión intrahipocampal de R-verapamil en ratas que aumentó el umbral posdescarga (UPD) en ratas que respondían y que no respondían a fenitoína. Los autores sugieren que al bloquear la GPP, el R-verapamil evita la hiperexcitabilidad mediada por esta proteína (Luna-Munguia et al., 2011). Con base en estos antecedentes, Asadi-Pooya y colaboradores añadieron un inhibidor de la GPP al tratamiento anticrisis a pacientes con epilepsia farmacorresistente. Después de ocho semanas, los autores reportaron que en 36% de los pacientes la farmacorresistencia se había revertido (Asadi-Pooya et al., 2013). La hipótesis de la sobreexpresión de transportadores como causante de la farmacorresistencia busca explicar la epilepsia farmacorresistente desde los hallazgos sobre la expresión de GPP y actualmente es una de las hipótesis más estudiadas (revisado por Czornyj et al., 2021).

Sin embargo, en la epilepsia farmacorresistente, la sobreexpresión de GPP no se restringe únicamente a elementos de la BHE. En tejido cerebral de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal farmacorresistente, Marchi y colaboradores reportaron expresión de GPP en 64% de las neuronas y 85% de los astrocitos parenquimales. Los autores describieron que la expresión de GPP aumentaba la supervivencia de neuronas y astrocitos al ser expuestos a concentraciones citotóxicas de fenitoína (Marchi et al., 2004). La expresión neuronal de GPP también se ha reportado en epilepsia del lóbulo frontal (Fonseca-Barriendos et al., 2022) y en esclerosis tuberosa (Lazarowski et al.,

1999), sugiriendo que esta alteración no depende de la etiología. Es importante destacar que, en condiciones fisiológicas, las neuronas no expresan GPP (Cordon-Cardo et al., 1989) y la expresión de dicha proteína en condiciones patológicas podría ser un mecanismo para aumentar la viabilidad celular en condiciones citotóxicas (Bankstahl et al., 2008; Marchi et al., 2004; Merelli et al., 2019; Volk, Burkhardt, et al., 2004).

La expresión neuronal de GPP también se ha descrito en modelos animales de crisis convulsivas severas repetidas. Lazarowski y colaboradores reportaron sobreexpresión de GPP en corteza cerebral e hipocampo de ratas sometidas a la inducción de 4 ó 7 crisis convulsivas severas por ácido 3-mercaptopropiónico (3MP). La administración de 3MP se utiliza como modelo de crisis convulsivas farmacorresistentes por lo que la expresión capilar fue asociada con farmacorresistencia. Sin embargo, la expresión neuronal de GPP no era esperada (Lazarowski et al., 2004). De forma similar, Volk y colaboradores reportaron expresión neuronal de GPP en hipocampo 24 h después de inducir *status epilepticus* en ratas (Volk, Burkhardt, et al., 2004). En línea con estos resultados, Merelli y colaboradores describieron la expresión neuronal de GPP en corteza cerebral de rata 15 días después del *status epilepticus*. Además, los autores reportaron que un pulso citotóxico de glutamato (300 $\mu$ M) fue capaz de inducir la expresión de GPP en un cultivo de neuronas corticales (Merelli et al., 2019). Estos antecedentes muestran que las crisis convulsivas repetidas y el *status epilepticus* inducen la sobreexpresión de GPP. Sin embargo, se desconocía si esta alteración ocurría desde la primera crisis convulsiva. Por lo tanto, Pérez-Pérez y colaboradores evaluaron la expresión de GPP en corteza cerebral e hipocampo de rata después de inducir una crisis única severa por 3MP. Los autores encontraron que una sola crisis convulsiva fue suficiente para inducir la sobreexpresión de GPP en corteza cerebral e hipocampo (Pérez-Pérez et al., 2021).

Auzmendi y colaboradores evaluaron la asociación entre estos dos eventos *in vivo*. Los autores indujeron crisis convulsivas repetidas por administración diaria de pentilenetetrazol (PTZ) por 7 días y reportaron la sobreexpresión de GPP en hipocampo. A continuación, los autores analizaron la excitabilidad hipocampal mediante registros *in vitro*. Estos resultados evidenciaron que la sobreexpresión de GPP en hipocampo se

asoció con hiperexcitabilidad neuronal, misma que era abatida cuando se añadía un inhibidor de la GPP a la solución (Auzmendi et al., 2013).

### 1.3. GPP e hiperexcitabilidad celular

La sobreexpresión de GPP se ha asociado con hiperexcitabilidad celular *in vitro*. Luz y colaboradores describieron que la transfección de esa proteína en células de ovario de hámster indujo resistencia a vinblastina, colchicina y doxorubicina. Además, los autores encontraron una relación positiva entre la expresión de GPP y la disminución del potencial de membrana en reposo (Luz et al., 1994). Este efecto podría ser consecuencia de la disminución en la cantidad de intercambiadores aniónicos, lo cual también explicaría la alcalinización de las células que expresan GPP (Luz et al., 1994; Valverde et al., 1992). Hoffman y colaboradores, utilizando el mismo modelo, encontraron que la alcalinización celular y la disminución del potencial de membrana en reposo se asocian directamente con la expresión de GPP y la resistencia a citotóxicos (Hoffman et al., 1996). Romsicki y colaboradores demostraron que la GPP actuaba como *flippasa* en un modelo de proteoliposomas. Esta función es capaz de cambiar la distribución de los fosfolípidos, como la fosfatidilserina, en la membrana celular, lo cual altera el potencial de membrana en reposo (Romsicki & Sharom, 2001). A partir de estas observaciones, Lazarowski y colaboradores propusieron que la expresión neuronal de GPP en pacientes con epilepsia (o modelos animales de crisis repetidas) modificaría el potencial de membrana en reposo de las neuronas favoreciendo un estado de hiperexcitabilidad (Figura 2) (Lazarowski et al., 2007).

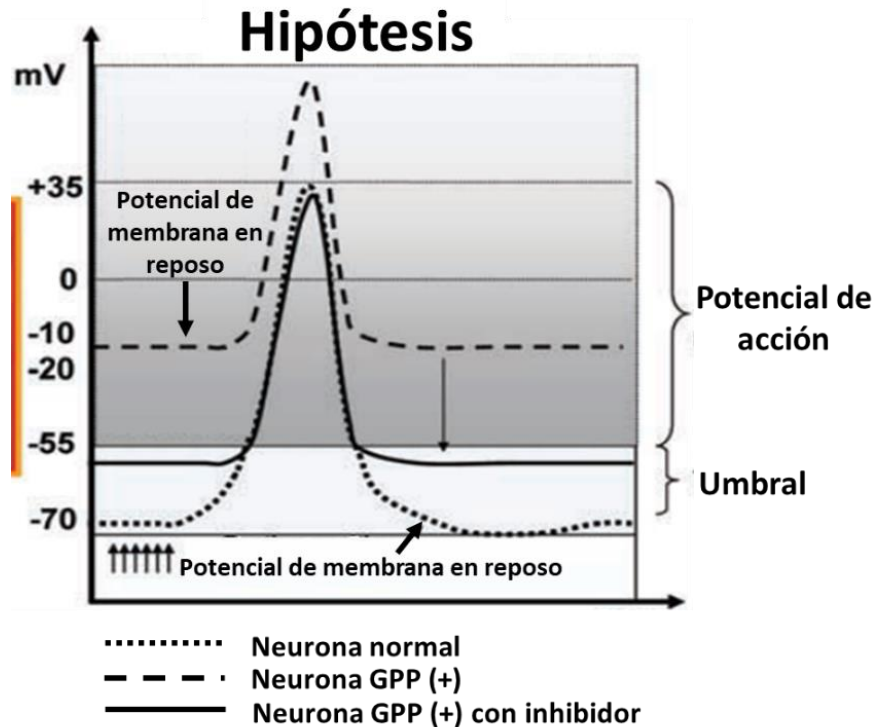


Figura 2 Hipótesis de la hiperexcitabilidad neuronal mediada por GPP (modificado de Lazarowski et al., 2007). En condiciones fisiológicas, las neuronas presentan un potencial de membrana en reposo de -70mV. (línea punteada). De acuerdo con los antecedentes, la expresión de GPP es capaz de reducir el potencial de membrana en reposo, favoreciendo la hiperexcitabilidad neuronal (línea discontinua). Por lo tanto, la administración de un inhibidor de GPP revertiría el estado de hiperexcitabilidad, regresando el potencial de membrana a -70mV (línea continua).

Para determinar la asociación entre la sobreexpresión de GPP y la hiperexcitabilidad en SNC, Auzmendi y colaboradores indujeron crisis severas repetidas en ratas mediante la administración diaria de PTZ. Después de 7 administraciones, los autores reportaron la sobreexpresión de GPP en hipocampo. A continuación, realizaron registros de potenciales excitatorios postsinápticos de campo y observaron que los animales sometidos a crisis repetidas presentaban hiperexcitabilidad hipocampal. Después, agregaron fenitoína al baño de las rebanadas de tejido y encontraron que la adición del fármaco anticrisis no modificó la hiperexcitabilidad, sugiriendo que las crisis repetidas indujeron farmacoresistencia. Por último, agregaron un bloqueador de la GPP a la solución y observaron que por sí solo no modificaba la respuesta registrada pero

cuando se combinaba con fenitoína era capaz de revertir el estado de hiperexcitabilidad (Auzmendi et al., 2013). Estos antecedentes sugieren que la expresión neuronal de GPP ocurre en consecuencia de las crisis convulsivas repetidas y al modificar el potencial de membrana en reposo de las neuronas estaría facilitando la ictogénesis.

Con base en las observaciones previas en crisis convulsivas repetidas, Pérez-Pérez y colaboradores evaluaron la expresión de GPP en corteza cerebral e hipocampo en respuesta a una sola crisis convulsiva generalizada inducida por administración de 3MP. Los autores demostraron que una sola crisis convulsiva generalizada es capaz de inducir sobreexpresión de GPP en corteza cerebral e hipocampo (Pérez-Pérez et al., 2021).

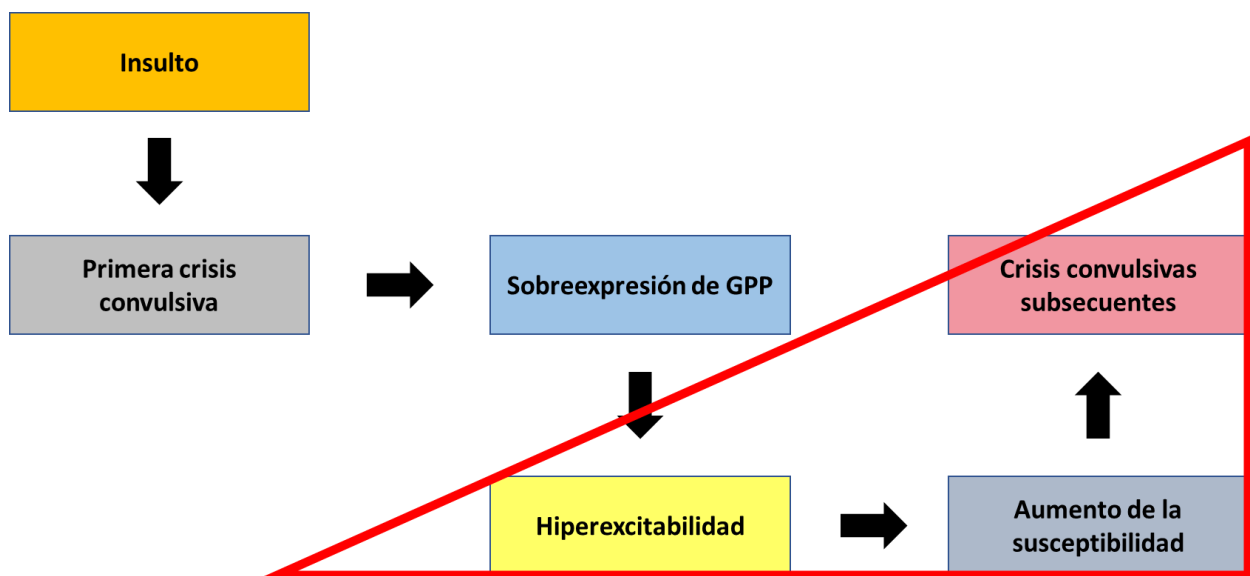


Figura 3 La sobreexpresión de GPP estaría asociada al incremento en la hiperexcitabilidad y aumento en la susceptibilidad a presentar crisis subsecuentes. De acuerdo con los antecedentes, la primer crisis convulsiva es capaz de inducir la sobreexpresión de GPP. La expresión neuronal de GPP favorecería la hiperexcitabilidad neuronal. El tejido hiperexcitable es más susceptible a presentar actividad epileptiforme y, por lo tanto, favorece la aparición de crisis convulsivas subsecuentes. El proceso de epileptogénesis está representado por el triángulo.

Estos antecedentes muestran que la sobreexpresión de GPP ocurre desde la primer crisis convulsiva y media la hiperexcitabilidad del tejido cerebral. Por lo tanto, la

sobreexpresión de GPP podría estar facilitando la inducción de nuevas crisis convulsivas y estaría asociada con el proceso de epileptogénesis (Figura 3).

#### 1.4. Epileptogénesis

Se define como epileptogénesis al proceso de adquisición y/o propagación de tejido susceptible a presentar actividad epiléptica (Pitkänen et al., 2015; Pitkänen & Engel, 2014). Este proceso patológico es iniciado por un insulto (trauma, malformación, crisis febriles, evento cerebral vascular, entre otros) y que, en presencia de factores como la localización y severidad del insulto, edad, factores genéticos y ambientales, provoca un reordenamiento continuo y progresivo de la red neuronal que provoca el desbalance entre los sistemas excitatorios e inhibitorios del SNC aumentando la susceptibilidad a presentar actividad epileptiforme (Löscher & Brandt, 2010). Debido a la carga que la epilepsia representa, la prevención del desarrollo de la epilepsia es algo atractivo. Sin embargo, para desarrollar estrategias preventivas se requiere entender los mecanismos detrás de la epileptogénesis (World Health Organization, 2019).

El modelo de *kindling* eléctrico amigdalino (KEA) es un modelo de epileptogénesis inducida por estimulación eléctrica. Este modelo involucra cambios neuronales permanentes que resultan en un estado de hiperexcitabilidad. El KEA se caracteriza por la progresión de las crisis focales a crisis focales secundariamente generalizadas (Rice & DeLorenzo, 1998). La progresión del KEA se asocia al reclutamiento de diversas estructuras cerebrales a la red aberrante durante la propagación de la actividad epileptiforme (Blumenfeld et al., 2007; Corcoran et al., 1975; Hewapathirane & Burnham, 2005).

En ratas, el KEA se divide en 5 fases de acuerdo con la escala de Racine (Racine, 1972). Las crisis de fase I se caracterizan por ser crisis focales de corta duración donde la actividad epileptiforme propaga de la amígdala ipsilateral al hipocampo ventral ipsilateral (Blumenfeld et al., 2007; Hewapathirane & Burnham, 2005) y a las cortezas perirhinal y entorhinal ipsilaterales (Figura 4) (Hirsch et al., 1997; Kajiwara et al., 2003). Las crisis de fase II son crisis focales de mayor severidad y duración en comparación a

las crisis de fase I. Durante esta fase, la actividad epileptiforme se propaga de la amígdala estimulada al hipocampo dorsal ipsilateral (Figura 4) (Hewapathirane & Burnham, 2005). Las crisis convulsivas de fase III son crisis focales secundariamente generalizadas, es decir, aquellas donde la actividad epileptiforme se propaga fuera de las estructuras límbicas ipsilaterales. La transición de la fase II a la fase III involucra la propagación de la actividad epileptiforme al circuito rhinencefálico (Rice & DeLorenzo, 1998) y al hipocampo contralateral (Hewapathirane & Burnham, 2005). A partir de la primer crisis fase III, todos los estímulos eléctricos provocan actividad epileptiforme en ambos hipocampos (Figura 4) (Hewapathirane & Burnham, 2005). Las fases IV y V se caracterizan por presentar crisis clónicas secundariamente generalizadas. Durante estas fases, la actividad epileptiforme se propaga a la corteza perirhinal contralateral y a la neocorteza frontal, parietal y temporal (Rice & DeLorenzo, 1998). La fase V se caracteriza por ser un estado irreversible. Una vez alcanzada dicha fase, los animales pueden permanecer sin estimulación durante largos periodos y no hay cambios en la susceptibilidad a las crisis (Figura 4) (Rice & DeLorenzo, 1998). Cabe destacar que la lesión de la corteza frontal interfiere con la adquisición del *kindling* (Corcoran et al., 1975). Cuando los estímulos eléctricos evocan crisis convulsivas de fase V en días consecutivos se considera que los animales han alcanzado el estado *kindled*. Dicho estado representa un cambio crónico de hiperexcitabilidad de la red neuronal pues a pesar de suspender los estímulos eléctricos tipo *kindling* durante largos periodos, la administración de estimulación eléctrica es capaz de evocar crisis convulsivas de fase V.

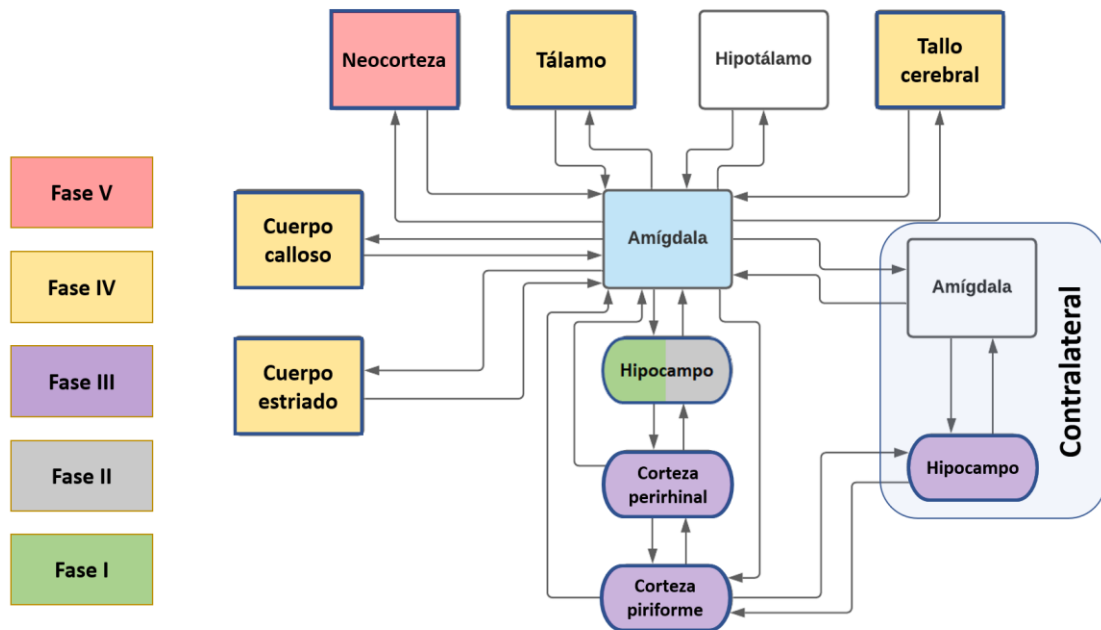


Figura 4 Propagación del *kindling* eléctrico amigdalino. La actividad epileptiforme de las crisis focales fase I y II propagan al hipocampo ipsilateral ventral y dorsal, respectivamente. Las crisis convulsivas de fase III se caracterizan por la propagación de la actividad epileptiforme al hipocampo contralateral. Durante las crisis convulsivas fase IV, la actividad epileptiforme propaga a estructuras del diencefalo y mesencefalo. Las crisis convulsivas de fase V se caracterizan por el reclutamiento de la corteza frontal.

El KEA presenta validez de constructo, aparente y predictiva (Cavazos et al., 1991; Cavazos & Sutula, 1990; Hewapathirane & Burnham, 2005; Mody, 1993; Mody & Heinemann, 1983), razones por las cuales ha sido frecuentemente utilizado para evaluar el efecto antiepiléptogénico de diversas sustancias (Tabla 2) y que, a diferencia de otros modelos, permite el control espacial y temporal de las crisis convulsivas.

Es importante notar que, a pesar del efecto antiepiléptogénico mostrado por diversos fármacos, estos fueron administrados previo a la estimulación eléctrica amigdalina y en dosis superiores a las utilizadas en la clínica como anticonvulsivo, provocando la aparición de efectos adversos (Tabla 2).



**Tabla 2 Fármacos con efecto antiepileptogénico en el modelo de KEA**

<b>Sustancia</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Dosis</b>	<b>Efectos adversos</b>	<b>Referencia</b>
<b>MK-801</b>	Antagonista NMDA	2 mg/kg	Hipotonía Esterotipia Ataxia	(Sato et al., 1988a)
<b>Valproato</b>	Potenciador GABA Inhibidor VGSC	400 mg/kg	Letargia Ataxia Pérdida de peso	(Silver et al., 1991)
<b>Fenobarbital</b>	Agonista GABA <sub>A</sub>	40 mg/kg	Ataxia Letargia	(Silver et al., 1991)
<b>Levetiracetam</b>	Inhibidor SVA2	50 mg/kg	Hiperactividad locomotora Tolerancia	(Löscher et al., 1997; Stratton et al., 2003)
<b>Lamotrigina</b>	Inhibidor VGSC	20 mg/kg	No especificado	(Stratton et al., 2003)
<b>Lacosamida</b>	Potencia el estado inactivo de VGSC	30 mg/kg	Crisis espontáneas	(Brandt et al., 2006)

NMDA: Receptor de N-metil-D-aspartato, SVA: Glicoproteína de vesícula sináptica A2, VGSC: Canal de sodio dependiente de voltaje.

### 1.5. Neuromodulación y estimulación eléctrica focal transcraneal

La modulación eléctrica de las funciones cerebrales (neuromodulación) es una aproximación terapéutica que se enfoca en restaurar el balance en la red neuronal

afectada por el trastorno epiléptico (Rocha, 2013). Existen varios mecanismos que explican como las diferentes técnicas de neuromodulación eléctrica ejercen sus efectos (Rocha, 2013). Sin embargo, lo que distingue a cada una de las técnicas de neuromodulación son las características del estímulo eléctrico (forma, duración, frecuencia, amplitud y polaridad) y los campos electromagnéticos que estos generan (Peterchev et al., 2012).

La estimulación eléctrica transcraneal aplica corriente eléctrica en el cráneo a través de electrodos colocados sobre el cuero cabelludo. Este tipo de neuromodulación no genera un campo eléctrico que abarca gran parte del parénquima cerebral (Peterchev et al., 2012). En pacientes con epilepsia farmacorresistente, la aplicación de estimulación eléctrica transcraneal redujo la frecuencia de las crisis convulsivas. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual se presentó este efecto o la relevancia de los fármacos anticrisis que estaban siendo administrados durante el protocolo (Yang et al., 2019). La estimulación magnética transcraneal genera un campo magnético a través del paso de corriente eléctrica a través de una bobina colocada perpendicular sobre el cráneo del paciente. A pesar de ser una técnica frecuentemente utilizada, existe incertidumbre con respecto a la distribución del campo eléctrico y la propagación de la respuesta en el cerebro (Peterchev et al., 2012; Siebner et al., 2022). Este tipo de neuromodulación ha sido utilizada en pacientes con epilepsia, sin embargo, estudios aleatorizados no han mostrado efectos claros sobre la frecuencia de las crisis convulsivas comparados al grupo control (Tavakoli & Heidarpناه, 2023). Además de la estimulación transcraneal, existen técnicas invasivas de neuromodulación. El nervio vago es un componente esencial del sistema nervioso autónomo, media la integración de información sensorial y proyecta al núcleo del tracto solitario, núcleo dorsal del rafe y al sistema límbico. Diversos autores han mostrado que la estimulación eléctrica del nervio vago reduce la frecuencia de crisis convulsivas en pacientes con epilepsia farmacorresistente, razón por la cual este abordaje fue de las primeras técnicas aprobadas para el tratamiento de pacientes con epilepsia focal farmacorresistente (Ahmadirad et al., 2023). A pesar de su eficacia anticonvulsiva, la estimulación del nervio vago presenta efectos adversos incluyendo alteraciones en la respiración durante el sueño (Gurung et al., 2020).

La estimulación eléctrica focal transcraneal (EFT) es una técnica novedosa de neuromodulación no invasiva que, a través de electrodos concéntricos tripolares, proporciona una densidad de corriente uniforme debajo del electrodo capaz de penetrar estructuras profundas como el hipocampo (Besio et al., 2011; Valdés-Cruz et al., 2019) (Fig. 5). Ensayos previos han demostrado que la EFT es segura, pues no causa daños tisulares (W.Besio et al., 2010), no induce muerte neuronal en hipocampo (Mucio-Ramírez & Makeyev, 2017) o altera la formación de memoria (Luby et al., 2014). La EFT ha mostrado efectos anticonvulsivos en modelos animales. Besio y colaboradores reportaron que la EFT aplicada 5 min después de iniciar el *status epilepticus* disminuyó la sincronidad del trazo y redujo la conducta convulsiva (Besio et al., 2007a). De forma similar, Santana-Gómez y colaboradores evaluaron el efecto de la EFT aplicada 30 min después de iniciar el *status epilepticus*. Los autores encontraron que la EFT disminuyó el voltaje y ritmicidad de la actividad epileptiforme en el hipocampo y que dicho efecto estaba asociado con evitar la sobreliberación de glutamato en esa estructura (Santana-Gómez et al., 2015). Como pretratamiento, la EFT fue capaz de potenciar una dosis subefectiva de diazepam y reducir la muerte neuronal en hipocampo inducida por *status epilepticus* (Besio et al., 2013). Por otra parte, Pérez-Pérez y colaboradores evaluaron el efecto de la aplicación de EFT antes de inducir una crisis convulsiva severa con 3MP y en animales con crisis convulsivas farmacorresistentes. Los autores encontraron que la EFT evitó la sobreexpresión de GPP en corteza cerebral e hipocampo inducida por una crisis severa y restauró la respuesta a fenitoína de los animales que previamente eran farmacorresistentes (Pérez-Pérez et al., 2021). Estos antecedentes muestran que la EFT es anticonvulsiva, disminuye la liberación de glutamato y evita la sobreexpresión de GPP inducida por una crisis única severa.

Por su parte, Valdés y colaboradores evaluaron el efecto de la EFT en la epileptogénesis en el modelo de KEA en gatos. Los autores reportaron que la administración de EFT inmediatamente después del estímulo tipo *kindling* evitó el aumento en la severidad de las crisis convulsivas, manteniendo a los animales en crisis focales durante 40 días, mientras que el grupo control había presentado crisis convulsivas de máxima severidad. Con estos datos los autores concluyen que la EFT administrada inmediatamente después del estímulo tipo *kindling* evita la propagación de las crisis

convulsivas interrumpiendo el establecimiento de redes aberrantes e interfiriendo con la adquisición de la epileptogénesis (Valdés-Cruz et al., 2019).

Estos antecedentes muestran que la EFT es antiepileptogénica, sin embargo, se desconoce si este efecto está asociado con evitar la sobreexpresión de GPP y el incremento en la hiperexcitabilidad cerebral.

## 1.6. Justificación

La sobreexpresión de GPP ocurre desde la primera crisis convulsiva generalizada y, al favorecer la hiperexcitabilidad celular, podría estar asociada con la epileptogénesis. Por otro lado, la EFT es anticonvulsiva, antiepileptogénica, inhibe la sobreliberación de glutamato y evita la sobreexpresión de GPP inducida por una crisis convulsiva generalizada. Sin embargo, se desconoce si el efecto antiepileptogénico está asociado con evitar la sobreexpresión de GPP durante la epileptogénesis.

## 2. Hipótesis

- La epileptogénesis se asocia al aumento progresivo en la expresión de GPP en áreas cerebral es que participan en la propagación de las crisis convulsivas.
- La EFT aplicada diariamente después de cada estímulo tipo KEA evitará la propagación de las crisis focales
- El efecto antiepileptogénico de la EFT estará asociado con evitar el aumento en la concentración proteica de GPP en áreas cerebrales asociadas con la propagación de las crisis convulsivas.

### 3. Objetivos generales

- Evaluar la expresión de GPP durante distintas fases de la epileptogénesis en áreas cerebrales que participan en la propagación de las crisis convulsivas.
- Analizar el efecto de la EFT diaria en la expresión y propagación de las posdescargas inducidas por el KEA
- Determinar si el efecto antiepileptogénico de la EFT está asociado con evitar el aumento en la concentración proteica de GPP en áreas cerebrales que participan en la propagación de las crisis convulsivas.

#### 3.1. Objetivos específicos

- a) Evaluar la expresión de GPP en áreas cerebrales específicas durante diferentes fases del KEA.
- b) Determinar si la aplicación de EFT diaria modifica la progresión del KEA.
- c) Analizar el efecto de la EFT diaria durante el KEA en la concentración proteica de GPP en áreas cerebrales específicas durante el KEA.

### 4. Metodología

#### 4.1. Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho de 300-350 g de peso. Los animales se alojaron en cajas de acrílico transparente, en ciclos luz/oscuridad de 12 h, a  $22\pm 2$  °C con acceso a agua y alimento *ad libitum*. El protocolo experimental se realizó de acuerdo con la Norma

Oficial Mexicana para uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062ZOO-1999) y el comité de ética del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” (proyecto NC123240.1).

## 4.2. Cirugía e implante de electrodos

Los animales se anestesiaron con una mezcla de Zoletil 50 (50mg/kg IM) y xilacina (12 mg/kg IM). Después se rapó la cabeza del animal, fue fijado en el marco estereotáxico y se realizaron los procedimientos de asepsia con una solución de yodopovidona al 10%. La cirugía inició con una incisión longitudinal sobre la línea media desde el vértice posterior de las cuencas oculares hasta el hueso occipital y se disecó el periostio para exponer el cráneo. Se realizaron 3 trépanos: el primero posterior a la unión parietofrontal sobre la línea ocular externa izquierda, el segundo anterior a la cisura parietooccipital izquierda sobre la línea ocular externa izquierda y el tercero en hueso occipital sobre la línea ocular externa derecha y se colocaron los tornillos de soporte (Figura 5). Utilizando como referencia el punto de unión entre bregma y la cisura media, se procedió a realizar un trépano en las coordenadas anteroposterior -2.8 y lateral +4.8. Dicho trépano permitió la implantación del electrodo de estimulación amigdalina el cual consistió en tres hebras de acero inoxidable aislados excepto en las puntas. Mediante el uso del marco estereotáxico, el electrodo de estimulación amigdalina fue implantado a una velocidad de 1 mm por cada 120 segundos, hasta alcanzar -8.6 mm de profundidad con respecto a las coordenadas de origen (Brandt, 2006) (Figura 5). Se colocó gasa hemostásica y cera ósea en el trépano para evitar la filtración y el electrodo se fijó al tornillo occipital con acrílico dental. Después se implantaron dos electrodos epidurales en ambas cortezas motoras (Figura 5). Los electrodos y los tornillos fueron soldados a un conector Berg macho y la preparación se fijó al cráneo con acrílico dental. Los animales tuvieron un periodo de recuperación de 7 a 10 días durante los cuales se proporcionaron cuidados básicos de herida quirúrgica y profilaxis antibiótica (enrofloxacina 12mg/kg VO).

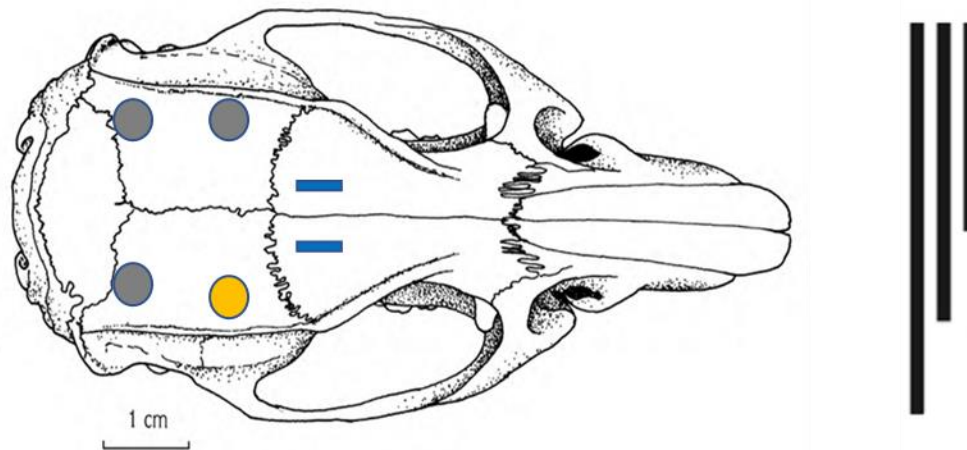


Figura 5 Esquema representativo del implante de electrodos. Se implantaron 3 tornillos de soporte (círculos grises), un electrodo tripolar de estimulación amigdalina (círculo amarillo) y 2 electrodos epidurales (barras azules). El electrodo de estimulación amigdalino se representa en la imagen derecha (modificado de Santos-Valencia et al., 2019).

### 4.3. UPD y KEA

Después del periodo de recuperación, se realizó la determinación del umbral posdescarga (UPD) que representa la corriente mínima necesaria para evocar la actividad epileptiforme en cada animal (Corcoran et al., 1975; Hewapathirane & Burnham, 2005). Para determinar el UPD, a cada rata se le aplicó un estímulo eléctrico compuesto por pulsos cuadrados monofásicos de 1 ms de duración a 60 Hz, con una duración total del tren de 1 s e iniciando con 100  $\mu$ A (Figura 6) a través de un estimulador Grass S11 (Grass, MA, USA). Se realizaron incrementos del 20% en la intensidad de corriente cada 2 min hasta evocar la posdescarga (o actividad epileptiforme)  $\geq$  4 s acompañada de algún cambio conductual asociado a crisis límbicas de acuerdo con la escala de Racine (Tabla 3) (Löscher & Schmidt, 1988; Palencia et al., 2011; Racine, 1972). Los estímulos tipo *kindling* iniciaron 24 h después aplicando diariamente la misma intensidad de corriente determinada en el UPD (Figura 6) hasta evocar tres crisis convulsivas de fase V en días consecutivos. Durante todo el protocolo se registró la conducta y la actividad electrográfica en amígdala y corteza frontal.

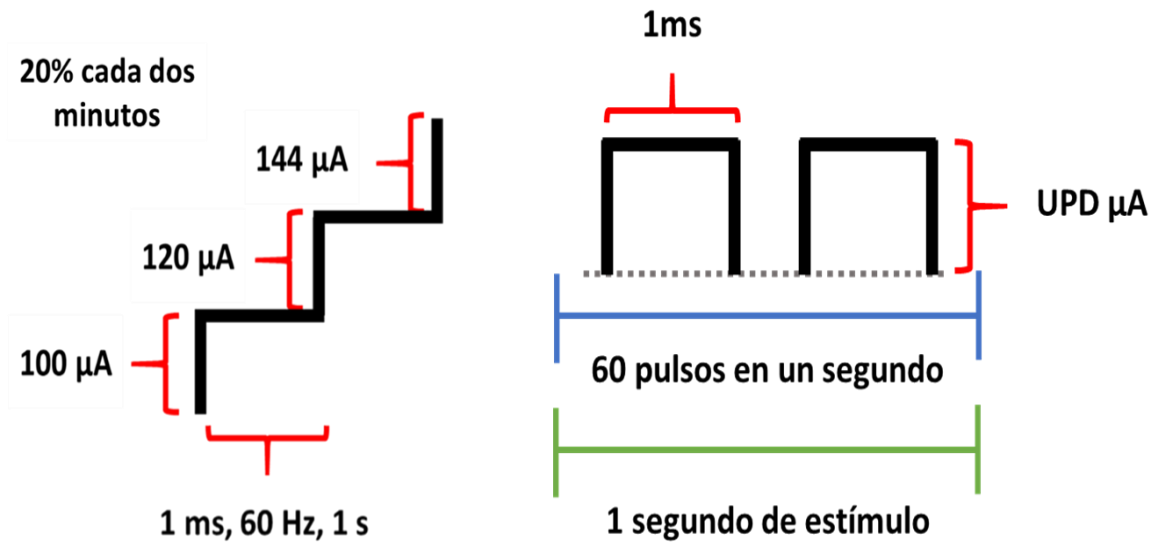


Figura 6 Determinación del UPD y KEA. La imagen izquierda representa el protocolo para determinar el UPD en el que se administran pulsos cuadrados monofásicos de 1 ms de duración a 60 Hz durante 1 s iniciando a 100 µA. Cada 2 min se realiza el incremento de 20% de la intensidad de corriente anterior hasta evocar un cambio conductual de acuerdo con la escala de Racine acompañado de actividad epileptiforme > 4 segundos. La imagen derecha representa el pulso eléctrico administrado para el KEA. Este estímulo está conformado por pulsos cuadrados monofásicos de 1 ms de duración a 60 Hz durante 1 s utilizando el UPD como intensidad de corriente.

**Tabla 3 Escala de Racine.**

Fase	Actividad
I	Movimientos faciales, parpadeo unilateral, aversión, congelamiento
II	Cabeceo, masticación
III	Mioclonías
IV	Postura de canguro
V	Postura de canguro con pérdida sustento



#### 4.4. Registros electroencefalográficos y actividad epileptiforme

La actividad electrográfica registrada del electrodo amigdalino y ambos electrodos de corteza frontal se obtuvo a través del equipo de registro poligráfico 78E (Grass, MA, USA). Los trazos fueron amplificados, filtrados entre 3-300 Hz y almacenados utilizando un equipo de conversión analógica-digital con una frecuencia de muestreo de 500 Hz (ADQH8, Ciudad de México, México). Tanto el equipo de conversión analógica a digital como el software utilizado son hechos a medida (Valdés-Cruz et al., 2012, 2019). Todos los trazos iniciaron con 30-60 s de actividad basal y concluyeron 1 min después de la última espiga de la posdescarga evocada. El análisis de los trazos se realizó off-line. Se midió la duración de la posdescarga, desde el artefacto de la estimulación hasta el fin de la actividad de alta amplitud y ritmicidad, y la frecuencia de espigas durante el desarrollo del KEA (Fernández-Guardiola et al., 1996; Y. L. Wang et al., 2018) (Figura 7).

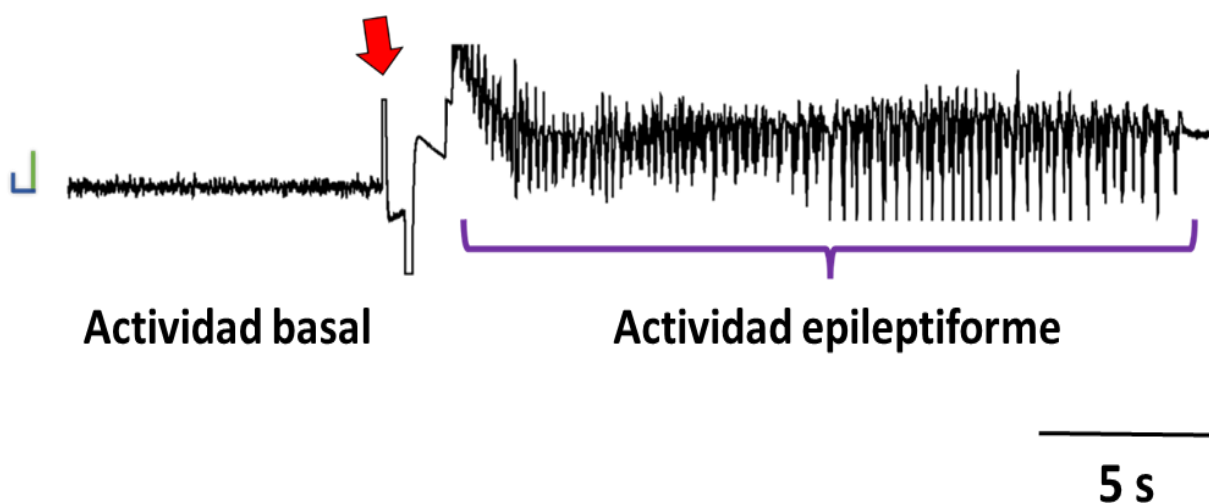


Figura 7 Registro de la actividad epileptiforme inducida por el KEA. Trazo representativo de 30 s que muestra la actividad basal (antes de la flecha roja), el artefacto de la estimulación eléctrica (flecha) y la actividad epileptiforme (llave).

#### 4.5. Estimulación eléctrica focal transcraneal

La cirugía y el implante de electrodos se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en la sección 4.2. Excepto que, se implantó un electrodo concéntrico tripolar (ECT, 6 mm de diámetro) sobre la línea sagital, entre bregma y lambda (Figura 8). Los electrodos se soldaron a dos conectores Berg, uno para la EFT y el segundo para el KEA.

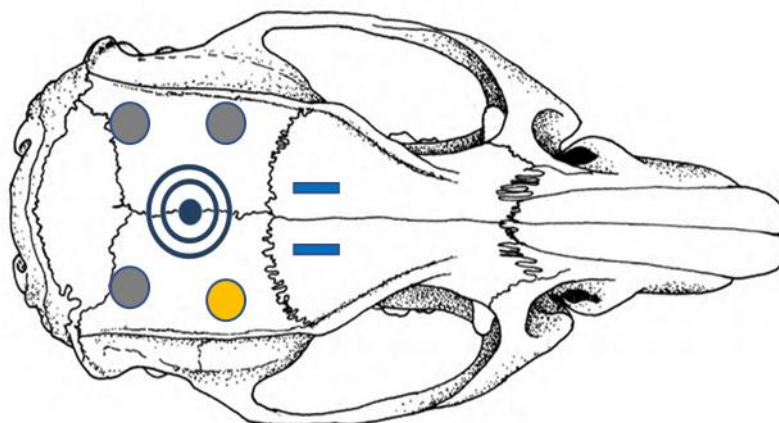


Figura 8 Esquema representativo del implante de electrodos para KEA y EFT. Se implantaron 3 tornillos de soporte (círculos grises), un electrodo tripolar de estimulación amigdalina (círculo amarillo), dos electrodos de registro epidural en la corteza motora (barras azules) y el ECT para la EFT sobre la línea media, entre bregma y lambda.

Se utilizó como referencia el modelo esférico reportado por Valdés-Cruz y colaboradores para determinar los parámetros de la EFT (Figura 9) (Valdés-Cruz et al., 2019). Utilizando dicho modelo, los autores estimaron la intensidad y profundidad del campo eléctrico que la EFT generaba. Así, los autores concluyen que la EFT crea un campo eléctrico capaz de activar e interrumpir con las neuronas activas durante la descarga epileptogénica en estructuras como la amígdala, corteza piriforme e hipocampo (Francis et al., 2003; Valdés-Cruz et al., 2019).

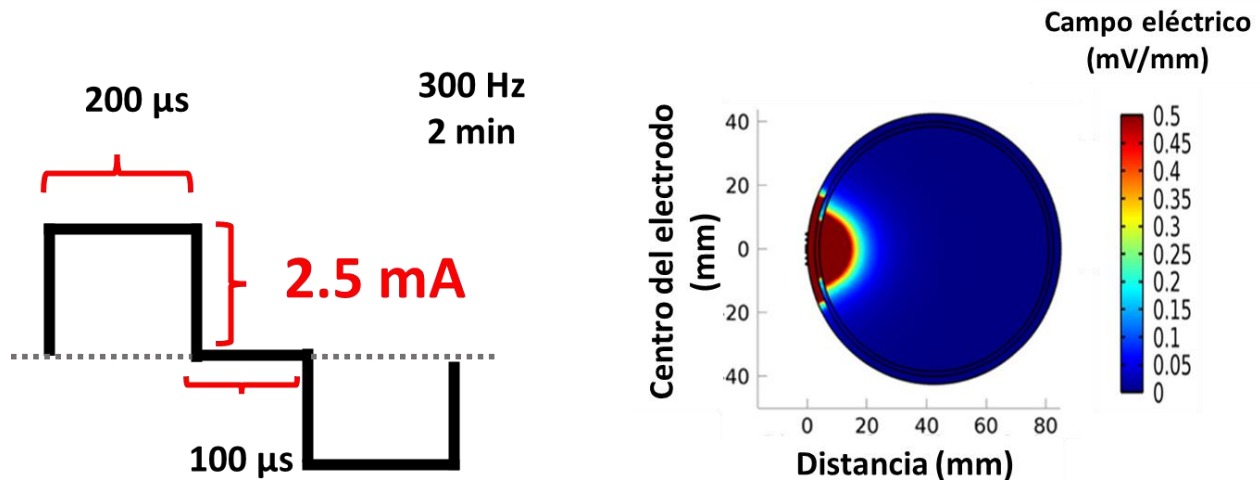


Figura 9 El campo eléctrico de la EFT penetra a estructuras subcorticales en el gato. La imagen izquierda representa los pulsos que conforman la estimulación EFT. La imagen de la derecha muestra el modelo esférico del cráneo del gato, así como la intensidad y profundidad que el campo eléctrico presenta durante la EFT (modificado de Valdés-Cruz et al., 2019).

Con base en este antecedente, la EFT en la rata debe generar un campo eléctrico de 0.45-0.5 mV/mm capaz de penetrar 7-9 mm para alcanzar estructuras como el hipocampo, amígdala y corteza piriforme (Paxinos & Watson, 2006). En 2011, Besio y colaboradores registraron cambios en el voltaje del hipocampo ventral de la rata en respuesta a corrientes crecientes de EFT. A partir de estos datos, los autores estimaron la intensidad del campo eléctrico que la EFT generaba en el hipocampo ventral (W. Besio et al., 2011).

Con base en estos antecedentes la EFT aplicada en este proyecto consistió en pulsos cuadrados simétricos bifásicos, de 200 μs de duración, 100 μs de interfase, a 300 Hz, por 2 min con una intensidad de corriente de 1.5 mA.

#### 4.6. Experimento 1: Evaluar la expresión de GPP en áreas cerebrales específicas durante las diferentes fases del KEA.

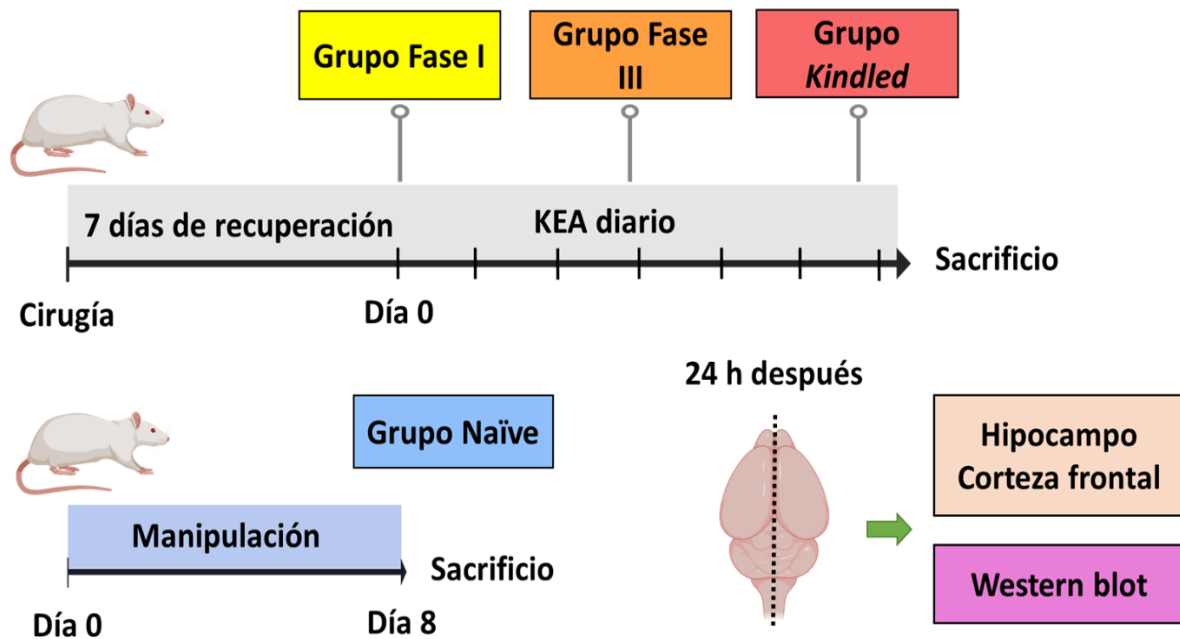
Este experimento nos permitió evaluar la expresión de GPP en estructuras de interés durante el proceso de epileptogénesis inducido por el KEA. Antes de iniciar, se realizó el

implante de animales piloto para verificar la correcta localización del electrodo de estimulación amigdalina. Tanto las fases a evaluar como las estructuras se definieron con base en la propagación de la actividad epileptiforme descrita en la sección 1.4. El diseño experimental está representado en la figura 10.

#### 4.6.1. Grupos experimentales

- Grupo *kindled* (n=5): Los animales fueron estimulados diariamente hasta presentar 3 crisis consecutivas de fase V. A continuación, fueron sacrificados mediante decapitación 24 h después de la última crisis fase V y se realizó la disección de corteza frontal e hipocampo del hemisferio ipsi- y contralateral con respecto a la amígdala estimulada. El tejido recolectado fue almacenado a -70 °C hasta la determinación de la expresión proteica de GPP mediante western blot.
- Grupo fase III (n=5): Este grupo se manipuló al igual que el grupo *kindled* excepto que los animales fueron estimulados diariamente hasta presentar la primera crisis convulsiva de fase III. El tejido se obtuvo de la misma forma que el grupo *kindled* excepto que los animales fueron sacrificados 24 h después de presentar la primera crisis convulsiva de fase III.
- Grupo fase I (n=5): Este grupo fue manipulado al igual que el grupo fase III, excepto que a los animales únicamente se les determinó el UPD. El tejido se obtuvo de la misma forma que el grupo fase III excepto que los animales fueron sacrificados 24 h después de determinar el UPD.
- Grupo naïve (n=5): Los animales fueron manipulados al igual que el grupo fase I del experimento 1 excepto que no fueron sometidos al implante quirúrgico de los electrodos ni recibieron estimulación eléctrica. El tejido se obtuvo de la misma forma que el grupo fase I excepto que los animales fueron sacrificados 24 h

después del último día de habituación. Los resultados de este grupo fueron considerados como condición control.



n=5 por grupo

Figura 10 Diseño experimental para evaluar la expresión de GPP en áreas cerebrales asociadas con la propagación de las crisis convulsivas en diferentes fases del KEA. Se obtuvieron 3 grupos experimentales de ratas previamente implantadas y sometidas al protocolo de KEA. Se realizó el sacrificio y disección de las estructuras de interés 24 h después de la última manipulación y se cuantificó la expresión proteica de GPP mediante western blot. Los datos fueron comparados contra los obtenidos de un grupo naïve, el cual únicamente fue habituado.

#### 4.6.2. Cuantificación de GPP mediante Western blot

El Western blot es una técnica sensible y semicuantitativa que permite analizar cambios en la expresión proteica incluso cuando ocurre en el rango de picogramos (Ghosh et al., 2014). Con los anticuerpos correctos, el Western blot es una técnica muy

sensible y específica, razones por las cuales se eligió para evaluar cambios en la expresión de GPP durante la epileptogénesis inducida por EKA.

Las muestras de tejido cerebral fueron homogenizadas en solución amortiguadora de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA y 0.1% Tritón X-100) con un coctel de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) en baño frío a 4 °C. A continuación, los homogenados fueron centrifugados a 14,000 x g durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante (extracto proteico total) fue recuperado, dividido en alícuotas y almacenado a -70 °C hasta su uso. La concentración proteica de los extractos fue evaluada mediante el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) utilizando albúmina de suero bovino (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) como estándar. Las muestras (50 µg) fueron hervidas por 5 min a 95 °C en solución amortiguadora de Laemmli (500 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 10%-mercaptoetanol y 0.1% azul de bromofenol). La electroforesis se llevó a cabo en solución amortiguadora de corrida (25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1% SDS, pH 8.3; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a 85 V por 30 min y 100 V por 2 h en un gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida (7.5%). La electrotransferencia se realizó a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF; Immun-Blot, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a 0.6 A por 30 min en solución amortiguadora de transferencia (25 mM Trizma base, 250 mM glicina y 20% etanol, pH 8.3). La unión inespecífica se bloqueó por 1 h a 4 °C con solución bloqueadora al 5% (Blot-QuickBlocker, EMD Millipore, Oakville, Ontario, CA, USA) disuelta en solución amortiguadora TBS-T (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5). Las membranas se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios a 4 °C con agitación leve. Los anticuerpos utilizados fueron: monoclonal de conejo anti-GPP (1:1000; Cat. Ab170904; Abcam, Waltham, MA, USA), monoclonal de conejo anti-actina (1:1000; Cat. Ab179467; Abcam, Waltham, MA, USA). Todos los anticuerpos primarios fueron diluidos en solución amortiguadora TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5). Después de la incubación se realizaron 3 lavados con solución amortiguadora TBS-T a 4 °C por 5 min cada uno. A continuación, se realizó la incubación del anticuerpo secundario HRP cabra anti-conejo IgG (1:5000 y 1:10,000 para GPP y actina, respectivamente) por 2 h a 4 °C. El anticuerpo secundario fue diluido en solución amortiguadora TBS. Posterior a la incubación, se realizaron 3 lavados con

solución amortiguadora TBS a 4 °C por 5 min cada uno. Finalmente, las membranas fueron incubadas en una solución de peróxido/luminol (Clarity Western ECL substrate, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a temperatura ambiente por 5 min. La señal quimo luminiscente fue normalizada usando actina como proteína constitutiva, obteniendo así un radio de expresión relativa. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

Los resultados de este experimento fueron comparados mediante análisis de varianza de una vía y prueba *post hoc* de Tukey. Además, la expresión relativa de GPP y los datos del KEA (UPD, días de estímulo, duración de la posdescarga y frecuencia de espigas) fueron sometidos al análisis de correlación de Spearman. La significancia estadística se estableció  $p < 0.05$ . El análisis estadístico y la construcción de gráficos se realizaron utilizando GraphPad Prism v.8.01 (GraphPad Software Inc., Boston, MA, USA).

#### 4.7. Experimento 2: Determinar si la aplicación de EFT diaria modifica la progresión del KEA en rata

El objetivo de este experimento fue determinar si la aplicación de EFT diaria inmediatamente después de cada estímulo del KEA modificaba la progresión de este.

##### 4.7.1. Grupos experimentales

- Grupo K + EFT (n=5): Después de la recuperación, se determinó el UPD de acuerdo con lo descrito en la sección 4.3. y 24 h después inició el protocolo de KEA diario. Inmediatamente después de cada estímulo KEA se aplicó la estimulación EFT a través del disco central y el anillo externo utilizando un estimulador Grass S88 (Grass, MA, USA). Este procedimiento se repitió diariamente por 20 días y se registró la actividad electroencefalográfica y la conducta de acuerdo con lo descrito en las secciones 4.3. y 4.4.

- Grupo *kindled* (n=5): Los animales fueron manipulados al igual que el grupo K + EFT excepto que no recibieron estimulación EFT y el protocolo terminó cuando presentaron 3 crisis convulsivas de fase V consecutivas.
- Grupo EFT (n=5): Los animales fueron manipulados al igual que el grupo *kindled* excepto que únicamente recibieron la EFT diariamente por 20 días.

#### 4.8. Experimento 3: Analizar el efecto de la EFT diaria durante el KEA en la concentración proteica de GPP en áreas cerebrales específicas durante el KEA.

Este experimento nos permitió evaluar el efecto de la aplicación diaria de EFT durante el KEA en la concentración proteica de GPP en áreas cerebrales específicas. El diseño experimental se muestra en la Figura 11. Las estructuras se definieron con base en la propagación de la actividad epileptiforme descrito en la sección 1.4.

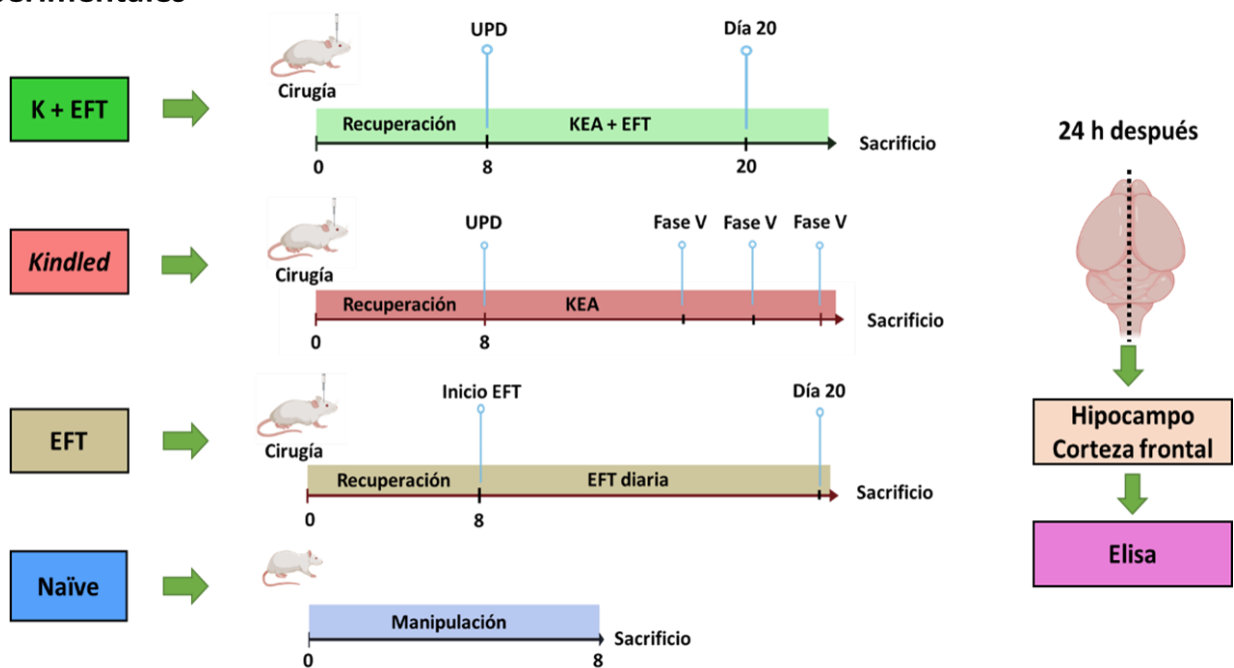
##### 4.8.1. Grupos experimentales

- Grupo K + EFT (n=5): Se utilizaron a los animales del grupo K + EFT del experimento 3 (sección 4.4.1.). Los animales fueron sacrificados mediante decapitación 24 h después de la última manipulación y se realizó la disección de corteza frontal e hipocampo de los hemisferios ipsi- y contralateral, con respecto a la amígdala estimulada. El tejido recolectado se utilizó para determinar la concentración proteica de GPP mediante Elisa (sección 4.5.2.).
- Grupo *kindled* (n=5): Se utilizaron a los animales del grupo *kindled* del experimento 3 (sección 4.4.1.). La obtención del tejido y el análisis de la concentración proteica se realizó al igual que en grupo K + EFT.



- Grupo EFT (n=5): Se utilizaron a los animales del grupo EFT del experimento 3 (sección 4.4.1.). La obtención del tejido y el análisis de la concentración proteica se realizó al igual que en grupo *kindled*.
- Grupo naïve (n=5): Los animales fueron manipulados al igual que el grupo EFT del experimento 3 (sección 4.4.1.) excepto que no fueron sometidos al implante quirúrgico de los electrodos ni recibieron estimulación eléctrica. La obtención del tejido y el análisis de la concentración proteica se realizó al igual que en grupo EFT. Los resultados de este grupo fueron considerados como condición control.

### Grupos experimentales



n=5 por grupo

Figura 11 Diseño experimental para evaluar la asociación entre el efecto antiepiléptico de la EFT y la concentración proteica de GPP en áreas cerebrales involucradas en la propagación de las crisis convulsivas.

#### 4.8.2. Ensayo de Elisa

Para cuantificar la concentración proteica se eligió realizar un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ensayo de Elisa), pues esta técnica es muy sensible y eficiente para hacer determinaciones cuantitativas de proteínas específicas dentro de una mezcla compleja (Sakamoto et al., 2018). El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del proveedor (US Biological Life Sciences Cat. 353596). De forma breve, se homogenizaron las muestras con solución amortiguadora de lisis (9 ml por cada gramo de tejido) en frío. A continuación, las muestras fueron centrifugadas por 5 min a 5000 x g a 4 °C y el sobrenadante fue recolectado. Se realizaron 2 lavados de la placa con solución de lavado y se cargaron 100 µL de cada concentración de la curva estándar y de las muestras diluidas (1:10 en solución de dilución). Se realizó una incubación de 90 min a 37 °C seguida por dos lavados. Después, se realizó la incubación de biotina (100 µL por pozo) durante 1 h a 37 °C. La incubación terminó mediante 3 lavados y se añadieron 100 µL por pozo de solución de trabajo que fue incubada por 30 min a 37 °C. Por último, se realizaron 5 lavados y se añadieron 90 µL de sustrato TMB a cada pozo. La placa se cubrió de la luz por 5 min y se realizó la lectura a 450 nM inmediatamente después de agregar la solución de detención (50 µL). La curva de calibración permitió calcular la concentración proteica (ng/ml) de cada muestra a partir de la densidad óptica.

Los resultados de este experimento fueron comparados mediante análisis de varianza de una vía y prueba *post hoc* de Tukey. Además, la expresión relativa de GPP y los datos del KEA (UPD, días de estímulo, duración de la posdescarga y frecuencia de espigas) fueron sometidos al análisis de correlación de Spearman. La significancia estadística se estableció  $p < 0.05$ . El análisis estadístico y la construcción de gráficos se realizaron utilizando GraphPad Prism v.8.01 (GraphPad Software Inc., Boston, MA, USA).

## 5. Resultados

Los ensayos preliminares revelaron que los electrodos de estimulación eléctrica estaban colocados en la amígdala basolateral. De acuerdo con lo anterior, la estimulación eléctrica de dicha estructura evocó cambios conductuales asociados con las crisis límbicas de origen amigdalino descritas por Racine (Racine, 1972).

### 5.1. La epileptogénesis inducida por KEA se asoció con aumento en la expresión de GPP en áreas cerebrales involucradas con la propagación de las crisis convulsivas

El grupo naïve no presentó ningún cambio conductual durante la habituación. El análisis por western blot mostró un índice de expresión relativa de GPP (GPP/actina) similar en ambos hipocampos ( $0.12 \pm 0.014$  y  $0.14 \pm 0.03$  hipocampo derecho e izquierdo, respectivamente). El análisis de corteza frontal mostró un índice relativo de expresión de  $0.13 \pm 0.023$  y  $0.12 \pm 0.018$  en hemisferio derecho e izquierdo, respectivamente (Figura 14).

El grupo fase I presentó un UPD de  $284 \pm 92 \mu\text{A}$ . Durante la determinación del UPD, el registro de la actividad electrográfica de la amígdala reveló que la posdescarga tuvo una duración de  $3.11 \pm 1.7$  s con una frecuencia de  $1.3 \pm 0.15$  espigas por segundo (Figuras 12 y 13). No se registró actividad epileptiforme en los electrodos epidurales. El análisis por western blot mostró un incremento del 85% en la expresión relativa de GPP en el hipocampo ipsilateral a la amígdala estimulada ( $0.24 \pm 0.048$ ,  $p < 0.001$  vs grupo naïve). No se encontraron cambios en la expresión relativa en el hipocampo contralateral ( $0.16 \pm 0.02$ ,  $p > 0.05$  vs grupo naïve) o en las cortezas cerebrales ( $0.10 \pm 0.054$  y  $0.15 \pm 0.04$  en corteza frontal ipsi- y contralateral, respectivamente, ambas  $p > 0.05$  vs grupo naïve) (Figura 14). No se encontraron correlaciones estadísticamente significativas.

En el grupo fase III, el UPD fue  $341 \pm 132 \mu\text{A}$  ( $p > 0.05$  vs grupo fase I) y fueron necesarios  $4 \pm 1$  estímulos tipo *kindling* para evocar la primer crisis fase III (Figura 12). El registro electrográfico reveló que la primera crisis fase III se asoció a una posdescarga

de  $13.31 \pm 7.14$  s ( $p > 0.05$  vs grupo fase I) con frecuencia de  $2.13 \pm 0.25$  ( $p < 0.001$  vs grupo fase I) espigas por segundo en la amígdala estimulada. La actividad epileptiforme se propagó a la corteza frontal y duró  $13.1 \pm 6.68$  s con frecuencia de  $1.67 \pm 0.76$  espigas por segundo (Figura 13). El análisis por western blot evidenció que la expresión relativa de GPP aumentó en 58.9% y 57.14% en hipocampo ipsi- y contralateral a la amígdala estimulada ( $0.20 \pm 0.03$  y  $0.22 \pm 0.049$ , ipsi- y contralateral, respectivamente, ambos  $p < 0.05$  vs grupo naïve y  $p > 0.05$  vs grupo fase I). No se encontraron cambios en la expresión relativa de GPP en corteza frontal ( $0.2 \pm 0.057$  y  $0.16 \pm 0.039$ , ipsi- y contralateral, respectivamente,  $p > 0.05$  vs grupo naïve y grupo fase I) (Figura 14). El análisis de correlación no evidenció ninguna correlación estadísticamente significativa.

El UPD del grupo *kindled* fue  $446 \pm 125$   $\mu$ A ( $p > 0.05$  vs grupos fase I y fase III) y se requirieron  $15 \pm 1$  estímulos tipo *kindling* para alcanzar el estado *kindled* (Figura 12). Durante la última crisis fase V, la posdescarga registrada en la amígdala estimulada duró  $75.29 \pm 44.63$  s ( $p < 0.01$  vs grupo fase III y  $p < 0.001$  vs grupo fase I) y tuvo una frecuencia de  $2.26 \pm 0.07$  ( $p < 0.001$  vs grupo fase I y  $p > 0.05$  vs grupo fase III). La posdescarga propagó a la corteza frontal y duró  $74 \pm 42.43$  s ( $p < 0.05$  vs grupo fase III) con frecuencia de  $2.2 \pm 0.11$  ( $p > 0.05$  vs grupo fase III) espigas por segundo (Figura 13). La expresión relativa de GPP aumentó 92% en hipocampo ipsilateral y 90% en hipocampo contralateral ( $0.249 \pm 0.035$  y  $0.271 \pm 0.06$ ,  $p < 0.001$  y  $p < 0.01$  vs grupo naïve, ipsi- y contralateral, respectivamente). Con respecto a la corteza frontal, el análisis por western blot mostró aumento del 93% y 143% en ambos hemisferios ( $0.26 \pm 0.07$  y  $0.299 \pm 0.04$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$  vs grupo naïve, ipsi- y contralateral, respectivamente) (Figura 14). El análisis de correlación reveló que la expresión relativa de GPP en hipocampo contralateral se correlacionó de forma positiva con la frecuencia de espigas durante las crisis de fase V (Figura 15).

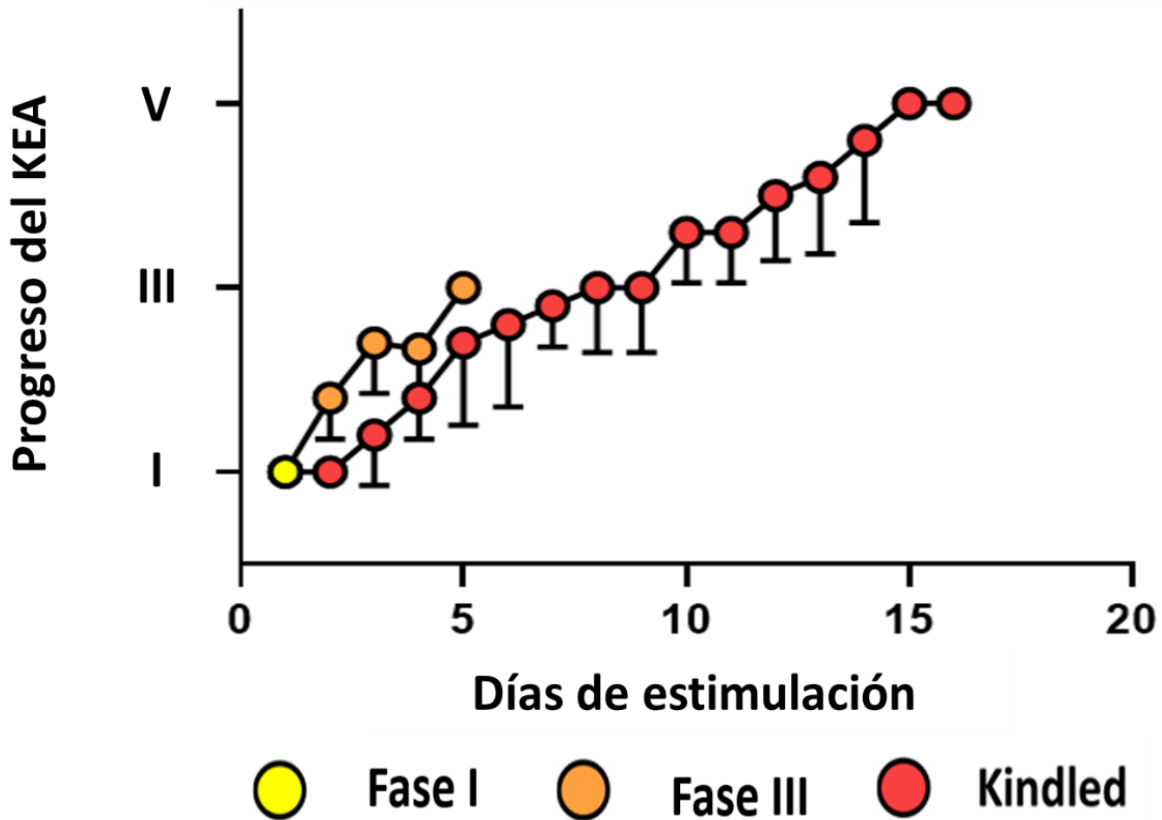
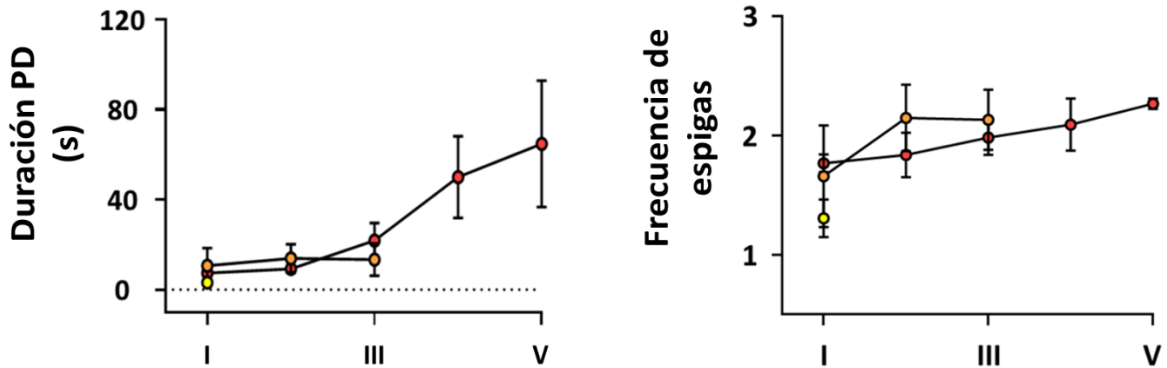
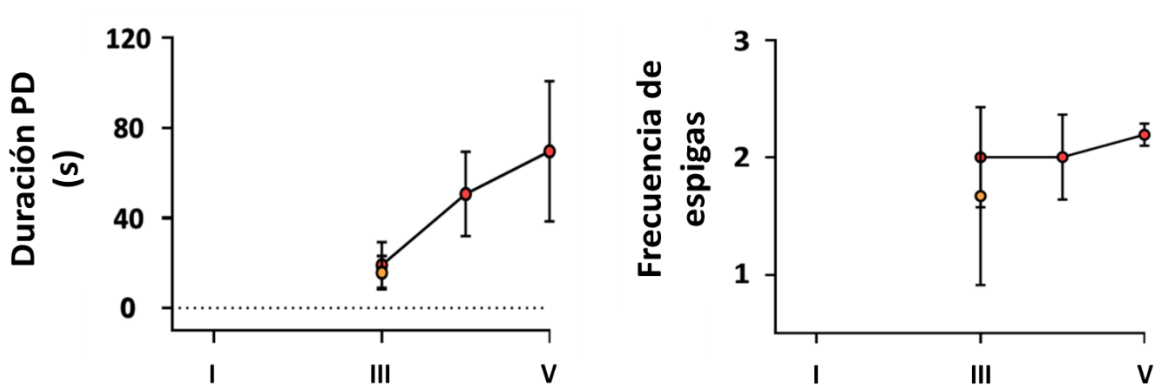


Figura 12 Aumento progresivo de las fases asociadas al proceso de epileptogénesis inducida por KEA. La gráfica representa el cambio conductual (media  $\pm$  DE) evocado por la estimulación tipo *kindling* en cada ensayo. n=5 para todos los grupos.

## Amígdala



## Neocorteza



● Fase I    ● Fase III    ● Kindled

n=5 por grupo

Figura 13 Aumento progresivo en la duración de la posdescarga y frecuencia de espigas durante el proceso de epileptogénesis inducida por KEA. Los datos representan media  $\pm$  DE. En los paneles superiores se muestra la duración de la posdescarga y la frecuencia de espigas (espigas por segundo) del registro de la amígdala durante el KEA. Los paneles inferiores muestran los datos obtenidos del registro en corteza frontal. Los datos se presentan de acuerdo con las fases I, III y V de la escala de Racine. n=5 para todos los grupos.

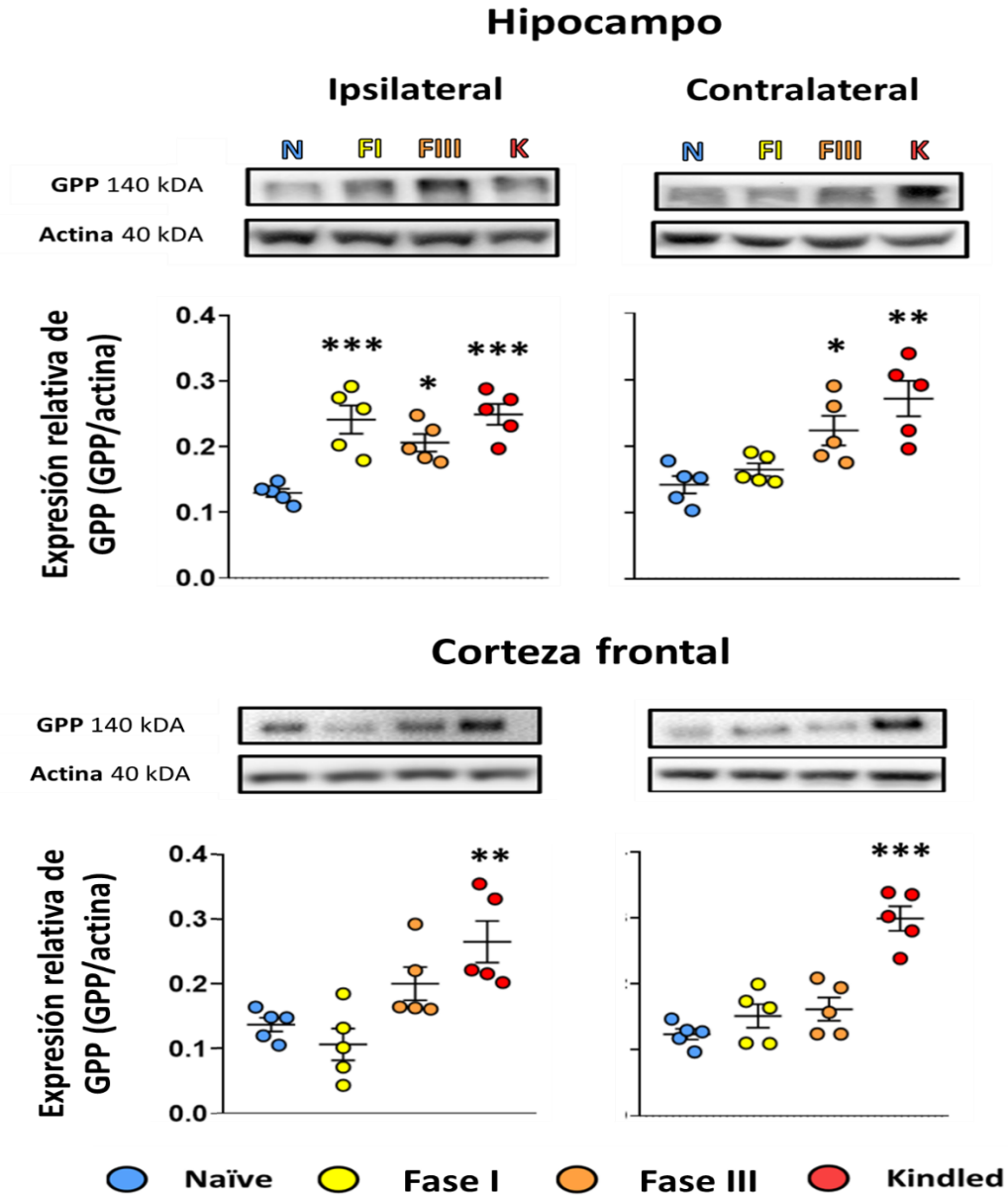


Figura 14 Aumento progresivo en la expresión proteica de GPP durante la epileptogénesis inducida por KEA. Las gráficas representan el índice de expresión de GPP (media  $\pm$  EE) con respecto a actina en hipocampo (paneles superiores) y corteza frontal (paneles inferiores). Las estructuras ipsilaterales se encuentran en la columna izquierda y las contralaterales a la amígdala estimulada en la columna derecha. En el grupo naïve, las estructuras derechas representan hemisferio ipsilateral y las estructuras izquierdas el hemisferio contralateral pues no se realizó el implante del electrodo de estimulación. Las imágenes representativas de la detección de GPP y su respectivo control de carga se encuentran en la parte superior de cada gráfico. Cada muestra fue evaluada por duplicado. La diferencia estadísticamente significativa entre grupos se representa por \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , y \*\*\* $p < 0.001$ . Análisis de varianza y prueba de Tukey.

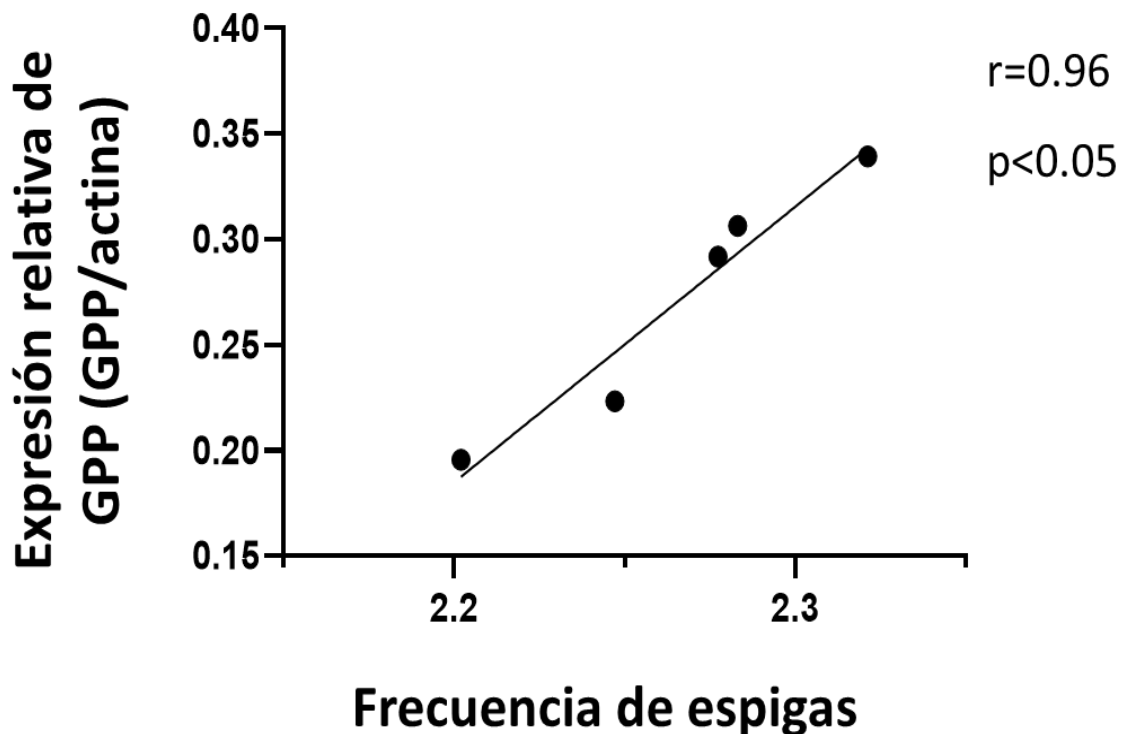


Figura 15 Gráfica que muestra la correlación positiva entre la expresión relativa de GPP en hipocampo contralateral y la frecuencia de espigas en amígdala durante las crisis fase V del grupo *kindled*.

## 5.2. La EFT aplicada inmediatamente después de cada estímulo tipo KEA evita la propagación de las crisis convulsivas

El grupo EFT no presentó ningún cambio conductual o alteración electroencefalográfica (Figura 17) durante la aplicación diaria de EFT por lo que no se incluyó en la gráfica de la figura 16. El UPD del grupo *kindled* fue  $356 \pm 73 \mu\text{A}$  y requirieron  $15 \pm 3.1$  estímulos para alcanzar el estado *kindled* (Figura 16). Durante la última crisis convulsiva fase V, la posdescarga en la amígdala duró  $88.27 \pm 18.16$  s y tuvo una frecuencia de  $3.14 \pm 0.26$  espigas por segundo. La posdescarga propagó a la corteza donde duró  $70.11 \pm 34.1$  s y tuvo una frecuencia de  $2.2 \pm 0.26$  espigas por segundo (Figura 17). El UPD del grupo K + EFT fue  $284 \pm 71 \mu\text{A}$  ( $p > 0.05$  vs grupo *kindled*). Durante



el protocolo experimental, la aplicación de estímulos K + EFT solo evocaron crisis convulsivas de fase I y II (Figura 16). Durante la última estimulación eléctrica, la posdescarga de la amígdala duró  $6.14 \pm 4.6$  s ( $p < 0.001$  vs última crisis convulsiva del grupo *kindled*) y tuvo una frecuencia de  $1.6 \pm 0.46$  espigas por segundo ( $p < 0.001$  vs última crisis convulsiva del grupo *kindled*) (Figura 17). La posdescarga de este grupo nunca propagó a la corteza frontal.

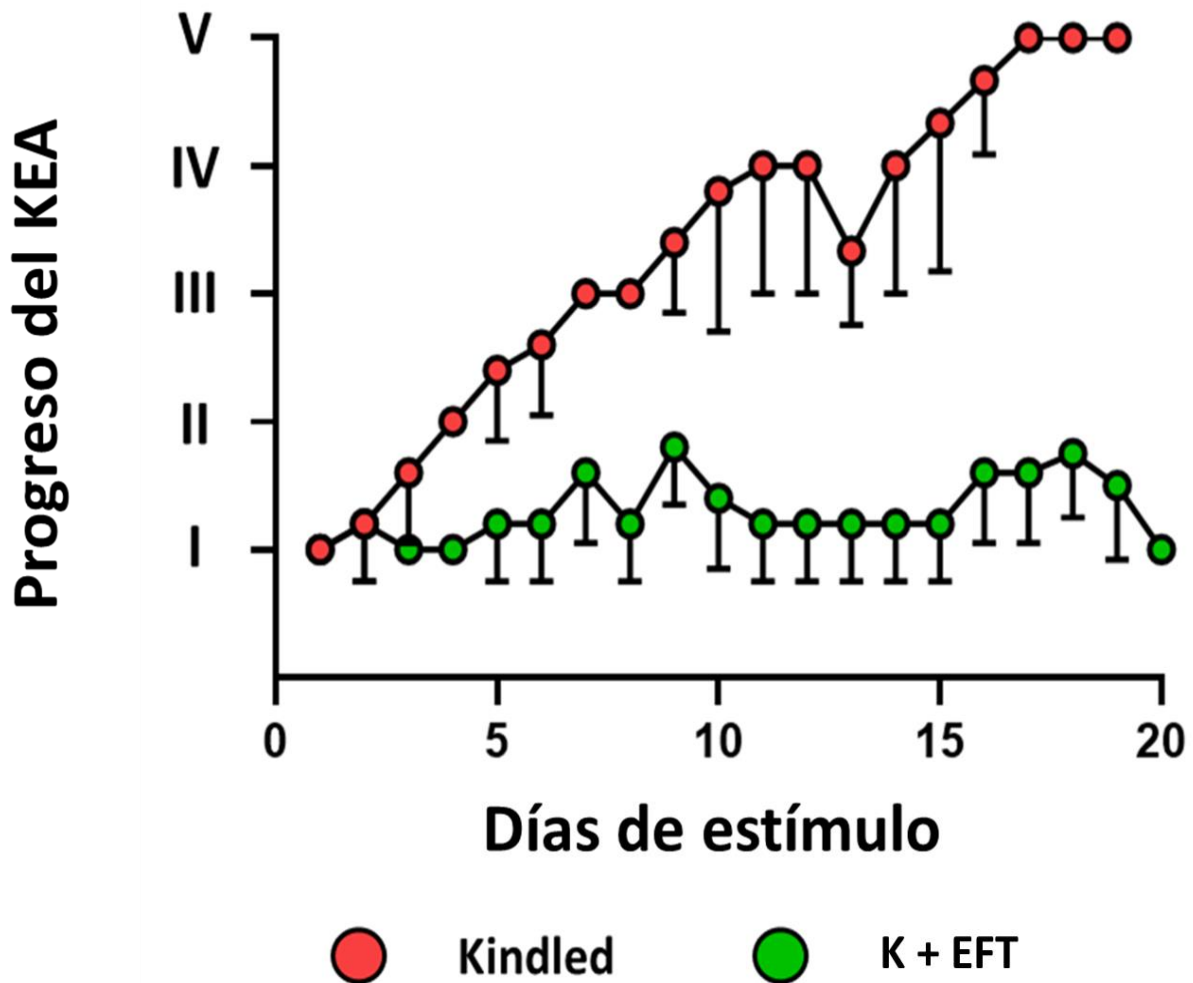
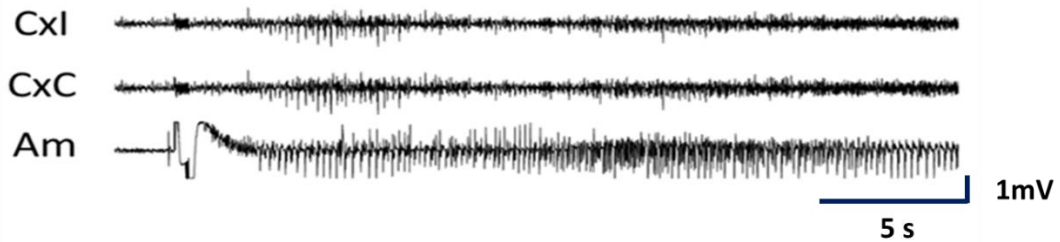
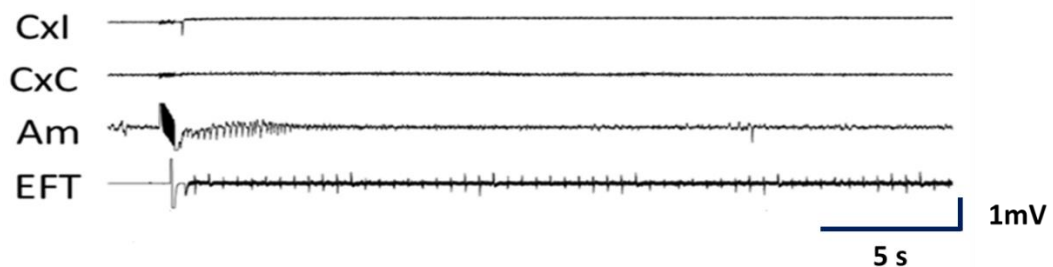


Figura 16 Gráfica que representa el efecto de la EFT aplicada inmediatamente después de cada estímulo tipo *kindling*. La gráfica representa el cambio conductual evocado (media  $\pm$  DE) por la estimulación tipo *kindling* en cada ensayo. El grupo EFT no está incluido pues no presentó cambios conductuales durante el protocolo.

### Kindled



### K + EFT



### EFT

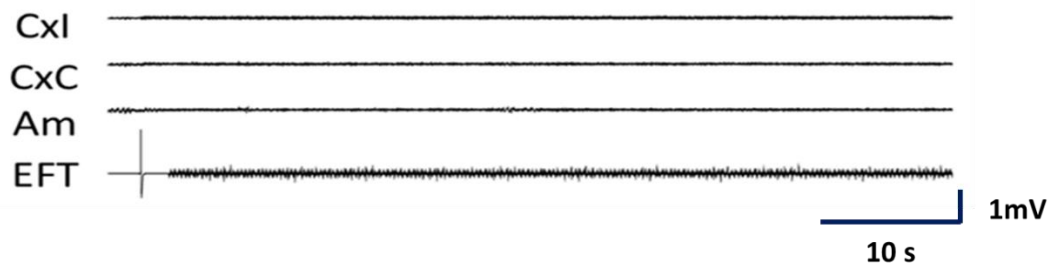


Figura 17 Trazos representativos de los grupos *kindled*, K+EFT y EFT. Los paneles muestran trazos representativos de la posdescarga de cada en el último día de estimulación. En el grupo *kindled*, el trazo muestra actividad rítmica y de alto voltaje en amígdala y ambos electrodos corticales. En contraste, el grupo K + EFT muestra actividad rítmica y de alto voltaje de corta duración solo en amígdala. En el grupo EFT no se aprecia actividad epileptiforme, únicamente el registro testigo de la estimulación focal transcraneal. AM: amígdala ipsilateral, CxC: corteza frontal contralateral, CxI: corteza frontal ipsilateral, EFT: registro de sincronía de la estimulación focal transcraneal, KEA: *kindling* eléctrico amigdalino.

### 5.3. La EFT evita el aumento en la concentración proteica de GPP durante la epileptogénesis inducida por KEA

El ensayo Elisa reveló que en el grupo naïve la concentración proteica de GPP fue  $48.05 \pm 12.61$  ng/ml en hipocampo derecho,  $39.99 \pm 8.63$  ng/ml en hipocampo izquierdo,

66.03  $\pm$  15.27 ng/ml en corteza frontal derecha y 50.47  $\pm$  10.03 ng/ml en corteza frontal izquierda (Figura 18). En el grupo EFT, la concentración proteica de GPP fue similar al grupo naïve en todas las estructuras analizadas (50.31  $\pm$  15.5 y 54.22  $\pm$  6.78 ng/ml, hipocampo ipsi- y contralateral, respectivamente; 60.55  $\pm$  8.88 y 59.75  $\pm$  10.69 ng/ml, corteza frontal ipsi- y contralateral, respectivamente;  $p > 0.05$  en todas las comparaciones) (Figura 18). En el grupo *kindled*, la concentración proteica de GPP aumentó en todas las estructuras analizadas: 132% en hipocampo ipsilateral (111.6  $\pm$  27.1 ng/ml,  $p < 0.001$  vs grupos naïve y EFT), 138% en hipocampo contralateral (95.31  $\pm$  24.17 ng/ml,  $p < 0.001$  vs grupos naïve y EFT), 51% en corteza frontal ipsilateral (99.92  $\pm$  32.63 ng/ml,  $p > 0.05$  vs grupo naïve y  $p < 0.05$  vs grupo EFT) y 92% en corteza frontal contralateral (97.3  $\pm$  13.76 ng/ml,  $p < 0.001$  vs grupo naïve y  $p < 0.01$  vs grupo EFT) (Figura 18). El análisis del tejido del grupo K + EFT mostró que la concentración proteica de GPP se mantuvo similar a la obtenida en el grupo naïve en ambos hipocampos (0.39% y 6%, 48.24  $\pm$  9.97 y 52.94  $\pm$  3.32 ng/ml, ipsi- y contralateral a la amígdala estimulada, respectivamente,  $p > 0.05$  vs grupo naïve y  $p < 0.001$  vs grupo *kindled*) y en ambas cortezas frontales (-0.7% y 3%, 62.73  $\pm$  8.17 y 62.29  $\pm$  12.7 ng/ml, ipsi- y contralateral, respectivamente,  $p > 0.05$  vs grupo naïve y  $p < 0.05$  vs grupo *kindled*) (Figura 18).

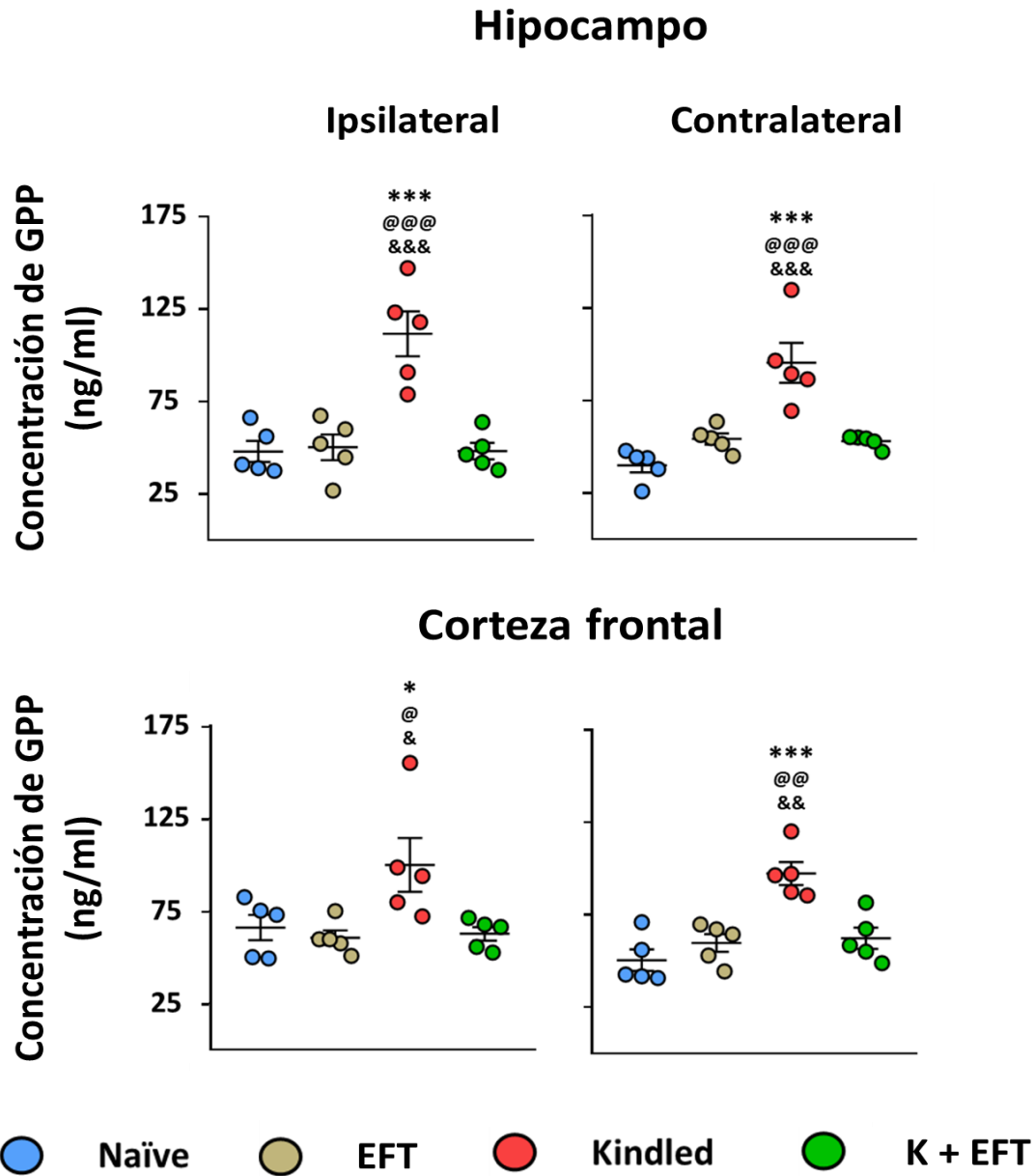


Figura 18 Concentración proteica de GPP en hipocampo y corteza frontal ipsi- y contralateral. A comparación del grupo *kindled*, el grupo K + EFT no presentó aumento en la concentración proteica de GPP en ninguna estructura analizada. La gráfica representa la concentración media  $\pm$  EE de GPP en hipocampo (paneles superiores) y corteza frontal (paneles inferiores) ipsi- y contralaterales al sitio de estimulación de los grupos experimentales. En el grupo naïve, las estructuras derechas representan el hemisferio ipsilateral y las estructuras izquierdas el hemisferio contralateral pues no se realizó el implante de electrodos. La diferencia estadística se indica por: \* $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0.001$  vs grupo naïve, @ $p < 0.05$ , @@ $p < 0.01$  y @@@ $p < 0.001$  vs grupo EFT; & $p < 0.05$ , && $p < 0.01$  y &&& $p < 0.001$  vs grupo K + EFT. Análisis de varianza con prueba de Tukey.

## 6. Discusión

Los resultados del presente trabajo mostraron que la epileptogénesis inducida por KEA está asociada con incrementos progresivos en la expresión de GPP. Este incremento es dependiente de la estructura cerebral y de la severidad de las crisis convulsivas. Por otro lado, el efecto antiepileptogénico de la EFT durante el KEA estuvo asociado con la intensidad del campo eléctrico y la inhibición de la sobreexpresión de la GPP.

### 6.1. Epileptogénesis inducida por KEA

La aplicación diaria de estímulos eléctricos en la amígdala basolateral indujo cambios electrográficos y conductuales asociados a crisis convulsivas de origen límbico que incrementaron en severidad. La progresión reportada en este estudio es similar a lo reportado por otros autores (Goddard et al., 1969; Liu et al., 2013; Rocha, Ackermann, et al., 1996) y por el grupo de investigación del laboratorio de neurofisiología del control y la regulación del Instituto Nacional de Psiquiatría (Domínguez Zúñiga, 2018).

La progresión del KEA se asocia al reclutamiento de diversas estructuras cerebrales a la red aberrante durante la propagación de la actividad epileptiforme (Blumenfeld et al., 2007; Corcoran et al., 1975; Hewapathirane & Burnham, 2005). El mecanismo molecular que media la adquisición del KEA está centrado en la plasticidad neuronal por sobreliberación de glutamato (Minamoto et al., 1992; Peterson et al., 1983; Trommer & Pasternak, 1990). Se asume que la aplicación de estímulos eléctricos provoca la despolarización de las terminales sinápticas generando un incremento en la concentración extracelular de glutamato. Esto debido a que la aplicación de glutamato en la amígdala es capaz de inducir el *kindling* y el bloqueo de receptores NMDA evita la progresión de este (Mori & Wada, 1987; Trommer & Pasternak, 1990). El glutamato activa receptores NDMA permitiendo la entrada de calcio a la terminal postsináptica. En las neuronas del hilus, el aumento intracelular de calcio es capaz de iniciar mecanismos de muerte neuronal (Cavazos et al., 1994; Cavazos & Sutula, 1990; Sato et al., 1988b;

Trommer & Pasternak, 1990). En respuesta a la muerte de células hilares, las células granulares activan mecanismos de reborización que son capaces de generar circuitos aberrantes (Cavazos et al., 1991). Por otro lado, la acumulación intracelular de calcio en neuronas glutamatérgicas induce mecanismos de potenciación a largo plazo que incluyen incrementos en la densidad y cinética de los receptores NDMA (Cavazos et al., 1994; Cavazos & Sutula, 1990; Kamphuis et al., 1986; Kghr et al., 1993; Mody et al., 1988; Mody & Heinemann, 1983, 1987; Sato et al., 1988b; Sato et al., 1990; Trommer & Pasternak, 1990). Así, la plasticidad neuronal y la formación de circuitos aberrantes se asocian con el aumento en la estimulación glutamatérgica en respuesta al siguiente estímulo eléctrico, facilitando el reclutamiento de nuevas estructuras cerebrales.

El mecanismo fisiopatológico del KEA le da la validez de constructo, pues replica los hallazgos reportados en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (Andrioli et al., 2007; Fisher et al., 1998; Schmeiser et al., 2017). Conductualmente, el KEA presenta la validez apariencia, pues las crisis de fase I y II comparten características conductuales con las crisis límbicas observadas en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal. Mientras que, las fases IV y V se manifiestan de forma similar a las crisis tónico-clónicas observadas en pacientes con epilepsia (McNamara, 1989). Por último, el KEA presenta la validez predictiva al ser reconocido como un modelo de tamizaje de fármacos anticrisis para el tratamiento de la epilepsia del lóbulo temporal y de tratamientos antiepileptogénicos (Löscher et al., 1997; Löscher & Rundfeldt, 1991; McNamara, 1989; Stables et al., 2003).

## 6.2. La epileptogénesis inducida por KEA se asoció con aumento en la expresión de GPP en áreas cerebrales involucradas con la propagación de las crisis convulsivas

Los resultados del experimento 1 revelaron la epileptogénesis inducida por KEA está asociada con incrementos progresivos en la expresión de GPP. Este incremento es dependiente de la estructura y de la severidad de las crisis convulsivas.

Diversos ensayos han demostrado que existe un aumento en la expresión de GPP en tejido cerebral resecado de pacientes epilepsia farmacorresistente (Fonseca-Barriendos

et al., 2022; Lazarowski et al., 1999; Marchi et al., 2004; Tishler et al., 1995). En estos pacientes, la sobreexpresión de GPP en elementos de la BHE limitaría la acumulación de fármacos anticrisis en el parénquima cerebral, reduciendo su eficacia y, por lo tanto, facilita el fenotipo de farmacorresistencia (Potschka et al., 2001, 2002; Potschka & Löscher, 2001). Mientras que, la expresión de GPP en células parenquimales se ha propuesto como un mecanismo compensatorio para aumentar la supervivencia celular en condiciones citotóxicas (Marchi et al., 2004; Volk, Burkhardt, et al., 2004; Wang et al., 2018; Wick et al., 2004). Se han descrito hallazgos similares en modelos animales de crisis convulsivas repetidas, en los cuales existe sobreexpresión de GPP en BHE y neuronas (Auzmendi et al., 2013; Lazarowski et al., 2004; Merelli et al., 2019; Volk, Burkhardt, et al., 2004). Recientemente, Pérez-Pérez y colaboradores describieron que una sola crisis convulsiva es suficiente para inducir la sobreexpresión de GPP en corteza cerebral e hipocampo de la rata (Pérez-Pérez et al., 2021), sugiriendo que la sobreexpresión de GPP no ocurre únicamente en crisis convulsivas repetidas o en epilepsia farmacorresistente. Así mismo, Rocha y colaboradores demostraron que existe sobreliberación de glutamato en la amígdala en respuesta a una dosis subconvulsivante de PTZ (Rocha, Briones, et al., 1996). Nuestros resultados muestran por primera vez que, la GPP se sobreexpresa durante la epileptogénesis inducida por KEA. Este cambio es evidente desde la primer posdescarga y depende del área cerebral involucrada en el proceso de epileptogénesis y la severidad de las crisis convulsivas.

### 6.2.1. Mecanismos moleculares asociados a la sobreexpresión de GPP

La sobreexpresión de GPP puede estar inducida por diversos mecanismos, incluyendo la hipoxia (Merelli et al., 2019; Wang et al., 2019), neuroinflamación (Bauer et al., 2007, 2008), hipoglucemia y/o la liberación excesiva de glutamato (Bankstahl et al., 2008; Bauer et al., 2008), todas ellas presentes durante la actividad convulsiva (Bateman et al., 2008; Das et al., 2012; During & Spencer, 1993; Moseley et al., 2010; Vezzani & Granata, 2005). La actividad epileptiforme se asocia con un aumento en la secreción de glutamato. El glutamato actúa sobre canales NMDA y estos, al ser activados, permiten la entrada de sodio y calcio (Sato et al., 1988b; Trommer & Pasternak, 1990). Además de

inducir mecanismos de plasticidad (LTP, *long term potentiation*) y neurotoxicidad, el calcio intracelular activa la ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2) y esta enzima induce la sobreexpresión de GPP. Aunque se desconoce la cascada de señalización de esta vía, la administración de inhibidores de la COX-2 evitó la sobreexpresión de GPP *in vivo* e *in vitro* (Bauer et al., 2008; van Vliet et al., 2010). Además de inducir la expresión de GPP, la activación de la COX-2 genera prostanooides que actúan sobre receptores acoplados a proteínas G y disminuyen el diámetro de los vasos sanguíneos promoviendo la hipoxia ictal y postictal (Farrell et al., 2017) (Figura 1). Durante la actividad convulsiva, existe un estado transitorio de hipoxia debido a la bradipnea, al aumento en la demanda de O<sub>2</sub> y/o disminución del flujo sanguíneo (Farrell et al., 2017; Lacuey et al., 2018; Pittau et al., 2013; GWang et al., 2019). Esta alteración en la disponibilidad de oxígeno induce la activación de factores de transcripción como el factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) y el factor nuclear *kappa* b (NF- $\kappa$ B). Es importante mencionar que ambos factores son capaces de translocar al núcleo e inducir la expresión de la GPP (Caltana et al., 2009; Kaewpila et al., 2008; Merelli et al., 2019; G. Wang et al., 2019). Merelli y colaboradores demostraron que exponer neuronas a un pulso citotóxico de glutamato (0.03 mM) indujo la translocación al núcleo de HIF-1 $\alpha$  y NF- $\kappa$ B y la subsecuente sobreexpresión de GPP en ausencia de hipoxia (Merelli et al., 2019) (Figura 19). Por último, en pacientes con epilepsia existe una relación entre hipometabolismo y el foco epileptogénico que, por su alto valor predictivo, se ha utilizado para delimitar la zona epileptogénica (Dienel et al., 2023; Ponisio et al., 2021). De forma similar, en el modelo de KEA se ha descrito que existe hipometabolismo en las estructuras límbicas ipsilaterales durante las fases tempranas (0-1) (Y. Wang et al., 2014). Se ha demostrado que la hipoglucemia induce la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ERO) a través de la activación de canales NDMA en cultivos neuronales (Páramo et al., 2010). En líneas celulares humanas, la hipoglucemia fue capaz de inducir la síntesis de ERO, la activación y translocación de HIF-1 $\alpha$  y NF- $\kappa$ B al núcleo, y la subsecuente sobreexpresión de GPP (Seebacher et al., 2015) (Figura 19). Estos antecedentes muestran que durante la actividad convulsiva existe un microambiente que induce la expresión de GPP en el tejido cerebral y favorece la hiperexcitabilidad.



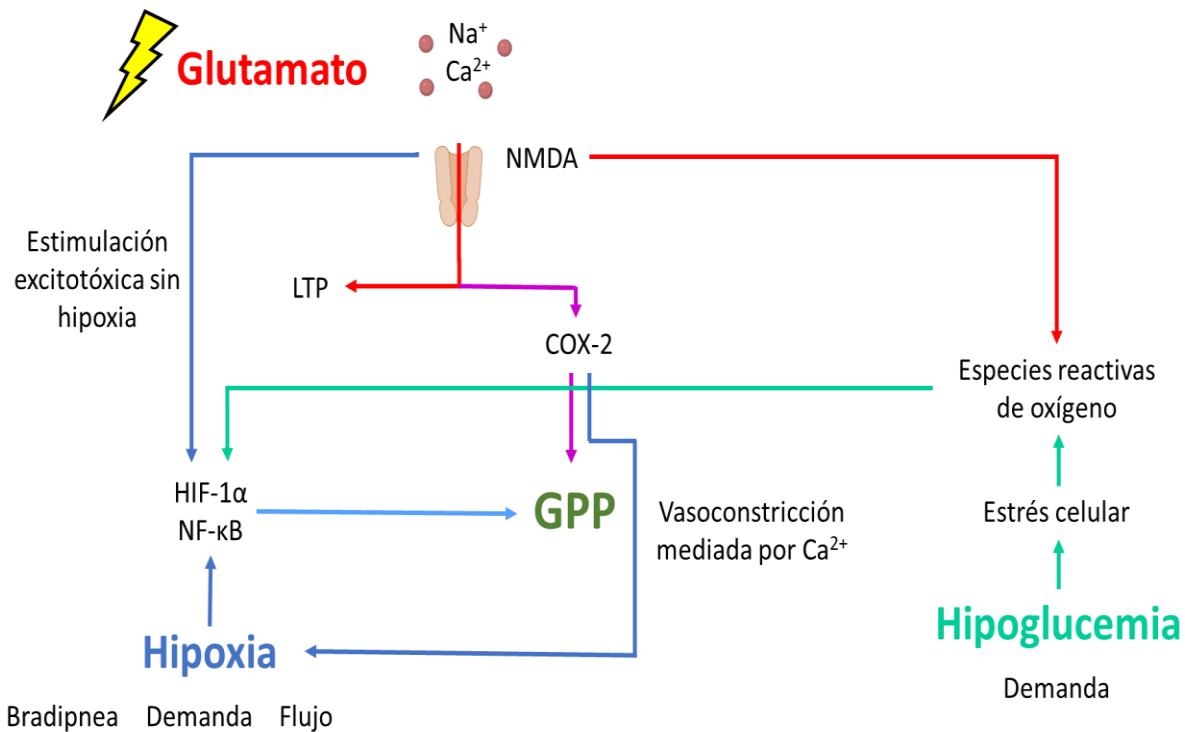


Figura 19 Mecanismos moleculares presentes durante la actividad convulsiva asociados a la sobreexpresión de GPP.

### 6.2.2. Mecanismos epigenéticos asociados a la sobreexpresión de GPP

Los microRNA (miR) son cadenas de RNA no codificante de una longitud menor a 22 nucleótidos, que regulan la traducción del RNAm interactuando con la región 3' de la región no codificante de los RNAm (Bartel, 2004). Se han descrito cientos de miR en los mamíferos y se estima que regulan la traducción de un tercio de las proteínas (L. P. Lim et al., 2005). Alteraciones en la expresión de miR se han asociado con distintas enfermedades neurodegenerativas (Eacker et al., 2009; Saugstad, 2010) y la epilepsia (J. Wang & Zhao, 2021). Jiménez-Mateos y colaboradores describieron que 21 miR estaban sobreexpresados y 12 miR presentaban disminución en la expresión en el hipocampo de ratones 24 horas después del *status epilepticus* (Jimenez-Mateos et al., 2011). Entre los miR sobreexpresados se encontraban miR-146 y miR-27. Zhang y colaboradores reportaron que el miR-146 se encontraba elevado desde las primeras 24 horas después del *status epilepticus* y alcanzaba el máximo nivel de expresión a los 7

días acompañado por sobreexpresión de GPP, periodo asociado a la epileptogénesis de este modelo. Además, los autores reportaron que el tratamiento con el inhibidor del miR-146 evitó la sobreexpresión de GPP, redujo la expresión de enzimas asociadas a la apoptosis, disminuyó la expresión de citocinas proinflamatorias y de la fosforilación de P65, la subunidad del NF- $\kappa$ B que actúa sobre el promotor del gen de la GPP (Zhang et al., 2018). Omran y colaboradores también hallaron sobreexpresión de miR-146 en hipocampo de pacientes con ELT farmacorresistente y durante el periodo latente (periodo de epileptogénesis) post *status epilepticus* en ratas inmaduras (Omran et al., 2012). En células endoteliales cerebrales humanas, la administración exógena de miR-27 aumentó la expresión de GPP. El miR-27 inhibe la glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK-3, glycogen synthase kinase-3), permitiendo la interacción de las proteínas Wnt en la superficie celular y la estabilización de la  $\beta$ -catenina. La  $\beta$ -catenina transloca al núcleo y actúa sobre el promotor de la GPP (Hammad et al., 2022; Lim et al., 2008). Interesantemente, no solo los miR son capaces de regular la expresión de GPP. Los RNA largos no codificantes (RNAInc) son cadenas con una longitud mayor a 200 nucleótidos que regulan la expresión génica actuando sobre los RNA, proteínas o compitiendo contra los miR (Matsui & Corey, 2017). En tejido hipocampal de ratones se demostró que existe incremento en la expresión de GPP y RNAInc H19 hasta 48 horas después del *status epilepticus*. Además, los autores indujeron el *knock down* de H19 mediante la administración de un adenovirus 21 días antes del *status epilepticus*. Los resultados revelaron que inhibir el RNAInc H19 evitó la sobreexpresión de GPP en varias regiones del hipocampo y que este efecto dependía de la regulación de la vía NF- $\kappa$ B (Xie et al., 2023). Estos antecedentes muestran que existen mecanismos epigenéticos que son capaces de regular la expresión de GPP durante la actividad convulsiva.

### 6.2.3. Sobreexpresión de GPP durante la adquisición del KEA: propagación de la actividad epileptiforme

Un hallazgo interesante de este trabajo fue que la determinación del UPD en animales naïve indujo la sobreexpresión de GPP en el hipocampo ipsilateral al sitio de estimulación. Ensayos previos han mostrado que en las fases tempranas del KEA (0-I) la actividad

epileptiforme se propaga al hipocampo ipsilateral incluso en una red previamente sana (Hewapathirane & Burnham, 2005; Wang et al., 2014). Además de la propagación de la actividad epileptiforme, las estructuras ipsilaterales muestran hipometabolismo 24 h después de la determinación del UPD (Wang et al., 2014). Es importante mencionar que el hipometabolismo es considerado un biomarcador del cambio en el consumo de glicógeno, alta demanda metabólica y actividad neuronal (Dalsgaard et al., 2007; Dienel et al., 2023; Rothman et al., 2022) (discutido en la sección 6.2.1.). Por lo tanto, la sobreexpresión de GPP en las etapas tempranas del KEA es consecuencia del ambiente que favorece la hiperexcitabilidad, caracterizado por el aumento en la concentración extracelular de glutamato,  $K^+$  y ERO (DiNuzzo et al., 2017; Rahman et al., 2000; Swanson & Choi, 1993). Con respecto al grupo fase III, la sobreexpresión de GPP estuvo presente en ambos hipocampos. Experimentos previos han mostrado que las crisis convulsivas de fase III se manifiestan cuando la actividad epileptiforme propaga por primera vez al hipocampo contralateral (Hewapathirane & Burnham, 2005) y está asociado con incremento en la concentración extracelular de glutamato en el hipocampo ipsilateral (Minamoto et al., 1992). Además, en el hipocampo contralateral se ha descrito hipometabolismo 24 h después de la primera crisis convulsiva de fase III, sugiriendo que existe esta estructura ha sido reclutada a la red neuronal aberrante (Y. Wang et al., 2014). En el grupo *kindled*, la GPP se sobreexpresó en ambos hipocampos y cortezas frontales, ipsi- y contralaterales al sitio de estimulación. La sobreexpresión de GPP en corteza frontal podría ser consecuencia del reclutamiento de dicha estructura durante las crisis convulsivas de fase V (Blumenfeld et al., 2007; Corcoran et al., 1975). Además, las crisis convulsivas de fase V están asociadas con aumento en la liberación de glutamato en la amígdala e hipocampo durante los periodos ictal e interictal (Batten et al., 2017; Kaura et al., 1995; Luna-Munguia et al., 2011; Minamoto et al., 1992) y mayor conectividad entre la amígdala y corteza frontal (Blumenfeld et al., 2007; Corcoran et al., 1975). Estos antecedentes muestran que la propagación de la actividad epileptiforme y la progresión del KEA se asoció con la sobreexpresión de GPP. Interesantemente, se encontró una correlación positiva entre la frecuencia de espigas durante las crisis de fase V y la sobreexpresión de GPP en el hipocampo contralateral. Esta correlación sugiere que la

hipersincronización de las redes neuronales aberrantes está asociada con la hiperexcitabilidad hipocampal mediada por la sobreexpresión de GPP.

#### 6.2.4. Hiperexcitabilidad asociada a la expresión neuronal de GPP

La sobreexpresión neuronal de GPP ha sido asociada con hiperexcitabilidad y, por lo tanto, podría facilitar la epileptogénesis (Czornyj et al., 2021). Esta hipótesis surge a partir de los hallazgos donde describen que la expresión de GPP modifica el potencial de membrana en reposo de las células (Auzmendi et al., 2013; Hoffman et al., 1996; Luz et al., 1994; Wadkins & Roepe, 1997). Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual ocurre esta alteración, se ha propuesto diversos mecanismos. Primero, la GPP actúa modulando canales de cloro dependientes de volumen (VGAC, *volumen-gated anion channels*). La GPP comparte estructura similar a los VGAC y la transfección de dicha proteína activa corrientes aniónicas rectificadoras. Así, la expresión de GPP podría modificar la concentración intracelular de cloro favoreciendo la hiperexcitabilidad (Valverde et al., 1992; Vanoye et al., 1999; Wadkins & Roepe, 1997). Otra hipótesis plantea que la GPP actúa modificando el pH celular. Con base en experimentos realizados en distintas líneas celulares se observó que la expresión de GPP no modificaba únicamente el potencial de membrana en reposo, sino que también incrementa el pH celular. Aunque se desconoce el mecanismo por el cual la GPP presenta dicho efecto, los autores proponen que pudiera ser consecuencia del incremento en la permeabilidad a cloro (Hoffman et al., 1996; Luz et al., 1994). Por último, la GPP es capaz de actuar como *flippasa*, lo cual explica sus sustratos lipofílicos. Así, la GPP puede intercambiar cadenas cortas de fosfolípidos de la membrana interna a la membrana externa. Entre dichos fosfolípidos se encuentra la fosfatidilserina, el único fosfolípido con carga negativa. Por lo tanto, la acción de *flippasa* de la GPP eliminaría la carga negativa que brinda la fosfatidilserina disminuyendo el potencial de membrana en reposo (Ma et al., 2022; Romsicki & Sharom, 2001).

Nuestros resultados muestran por primera vez que existe sobreexpresión de GPP durante la epileptogénesis inducida por KEA en áreas cerebrales involucradas en la

propagación de las crisis convulsivas. La sobreexpresión de GPP en dichas estructuras puede estar favoreciendo la hiperexcitabilidad y favoreciendo la epileptogénesis. Sin embargo, una limitación importante de nuestro estudio es que no realizamos el análisis de expresión de GPP por tipo celular. Ensayos futuros deberán enfocarse en analizar la expresión neuronal de GPP durante la epileptogénesis y el desarrollo de hiperexcitabilidad. Cabe mencionar que ensayos previos han evaluado la expresión neuronal de GPP durante el KEA sin encontrar cambios (Seegers et al., 2002a; Volk, Potschka, et al., 2004). Este resultado puede ser consecuencia del intervalo entre la última estimulación y el análisis del tejido, la especificidad del anticuerpo y las variables del protocolo (Volk et al., 2005).

### 6.3. La EFT aplicada inmediatamente después de cada estímulo KEA evita la propagación de las crisis convulsivas

Nuestros experimentos replicaron los resultados publicados previamente demostrando que la aplicación de EFT inmediatamente después de cada estímulo tipo *kindling* interfiere con la progresión del KEA, evitando la generalización de las crisis convulsivas (Valdés-Cruz et al., 2019). En este estudio, la intensidad de corriente de la EFT fue determinada a partir de la estimación de la intensidad del campo eléctrico que mostró el efecto antiepileptogénico en gato. A continuación, se estimó la intensidad de corriente necesaria para generar el campo eléctrico de la misma magnitud en a rata sin inducir daños tisulares (Besio et al., 2010, 2011; Luby et al., 2014; Mucio-Ramírez & Makeyev, 2017). Nuestros resultados muestran que 0.4 mV/mm de intensidad del campo eléctrico replicó el efecto antiepileptogénico en otra especie.

#### 6.3.1. Propiedades biofísicas de la EFT

El campo eléctrico aplicado sobre un tejido es capaz de generar cambios en la distribución de potenciales eléctricos sobre una región tridimensional poblada de procesos neuronales denominada volumen de tejido activado (VTA) (Hofmann et al.,

2011; Ng et al., 2023). Sin embargo, la distribución dentro del campo tridimensional no es homogénea y presenta anisotropía, es decir, las neuronas proyectan en diferentes direcciones y no presentan las mismas propiedades biofísicas (o conductividad) a lo largo del axón. Por lo tanto, el efecto del campo eléctrico sobre el tejido dependerá de la conductividad y de las propiedades intrínsecas de cada neurona, incluyendo la longitud del axón, mielinización y el periodo refractario (Hofmann et al., 2011; Ng et al., 2023). Los modelos computacionales hacen uso de estas variables para reportar los diferentes efectos que la neuromodulación puede ejercer en un tejido. En la siguiente sección se analizarán los distintos parámetros que componen la EFT para integrar el efecto observado en este trabajo. El estímulo de EFT consistió en un tren de 2 minutos de duración, a 300 Hz, de pulsos cuadrados simétricos y bifásicos de 200  $\mu$ s de duración, con un desfase de 100  $\mu$ s y a una intensidad de corriente de 1.5 mA. La frecuencia óptima de la neuroestimulación depende de las propiedades intrínsecas de las neuronas blanco que se quieren estimular. Para la EFT, el objetivo era desincronizar las neuronas durante la actividad epileptiforme, por lo que se utilizó una frecuencia alta (300 Hz) para lograr el desacople soma-axón e interferir con la despolarización (Hofmann et al., 2011; Ng et al., 2023). El voltaje se define como la diferencia en el potencial eléctrico entre dos puntos, mientras que la corriente se define como el flujo de partículas en un medio. La estimulación con voltaje fijo depende de la acumulación de cargas entre dos puntos, sin embargo, está sujeta a la impedancia (fuerza que se opone al flujo eléctrico) del tejido. El uso de corriente fija elimina la variable de impedancia del tejido permitiendo administrar a todos los sujetos la misma cantidad de energía (Hofmann et al., 2011; Ng et al., 2023). La amplitud (1.5 mA) se define como la máxima magnitud de estimulación durante el pulso. La amplitud definirá el VTA, la magnitud de la respuesta y la dispersión del campo eléctrico (Hofmann et al., 2011; Ng et al., 2023). El ancho de pulso se define como la duración del pulso de estimulación (200  $\mu$ s). El ancho de pulso define la carga administrada al tejido pues es el tiempo que la corriente está siendo administrada y está relacionada con el VTA (Hofmann et al., 2011; Ng et al., 2023). Los pulsos bifásicos se componen de un pulso catódico y un pulso anódico. La corriente catódica es capaz de despolarizar las dendritas e hiperpolarizar el axón de una neurona dispuesta en vertical. La corriente anódica hiperpolariza las dendritas y despolariza el axón. Por lo tanto, el efecto de la

corriente bifásica será la activación selectiva de neuronas de acuerdo con su orientación espacial (Hofmann et al., 2011; Ng et al., 2023). La forma de la onda (cuadrada) define la administración de carga a lo largo del tiempo. Los pulsos simétricos (misma duración e intensidad) aseguran que el flujo de corriente evita la administración neta de carga al tejido, evitando la degradación y el daño (Hofmann et al., 2011; Ng et al., 2023). Por último, el desfase permite aumentar la eficacia de la corriente catódica y anódica (Hofmann et al., 2011; Ng et al., 2023). Con base en esto, el efecto de la EFT sobre las redes neuronales dependerá de la conductividad y de las propiedades intrínsecas de las neuronas expuestas al campo eléctrico.

### 6.3.2. Mecanismo propuesto en el efecto antiepileptogénico de la EFT

La progresión del KEA está asociada con incremento en la liberación de glutamato y la activación de receptores NMDA (Minamoto et al., 1992; Peterson et al., 1983; Rocha, Briones, et al., 1996; K. Sato et al., 1988b). Aunque se desconocen los mecanismos que modulan el efecto antiepileptogénico de la EFT, existe evidencia de que la EFT es capaz de reducir la liberación excesiva de glutamato en el hipocampo durante el *status epilepticus* inducido por pilocarpina (Santana-Gómez et al., 2015). Evitar la sobreliberación de glutamato durante la actividad epileptiforme prevendría la activación de mecanismos de plasticidad neuronal que están asociadas con el reclutamiento de estructuras cerebrales involucradas en la propagación de las crisis convulsivas durante la progresión del KEA (Figura 20).

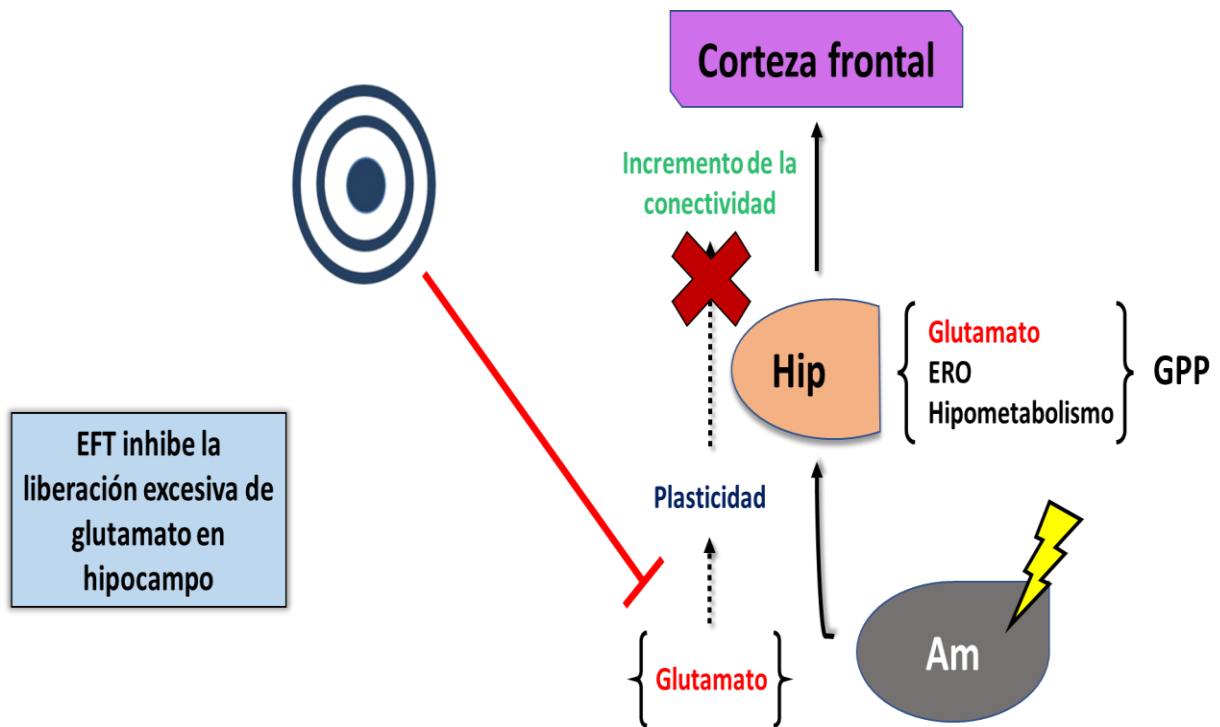


Figura 20 Mecanismo propuesto en el efecto antiepiléptico de la EFT. El glutamato es esencial para inducir mecanismos de plasticidad neuronal que permiten la propagación de la actividad epileptiforme durante la adquisición del KEA. Existe evidencia mostrando que la EFT evita la sobreliberación de glutamato durante la actividad epileptiforme. Por lo tanto, inhibir la sobreliberación de glutamato durante el KEA evitaría la inducción de mecanismos de plasticidad involucrados en la propagación de las crisis focales.

Otro mecanismo que podría estar involucrado en el efecto antiepiléptico de la EFT es el bloqueo de conducción axonal. Este efecto ocurre en respuesta a la aplicación de estímulos de alta frecuencia (>50 Hz) provocando la desincronización de potenciales de acción. Aunque la estimulación de baja frecuencia se asocia con activación neuronal, la estimulación de alta frecuencia no es capaz de inducir la activación neuronal. El bloqueo de conducción axonal está asociado con el incremento en la concentración extracelular de potasio. Este cambio en la acumulación de cargas genera la inactivación tónica de los canales de sodio y provoca que no se puedan generar potenciales de acción. (Bikson et al., 2001; Jensen & Durand, 2009). La EFT, por ser un estímulo de alta frecuencia, provocaría la inactivación de grupos neuronales necesarios para la



propagación de la actividad epileptiforme, evitando la generalización de las crisis convulsivas.

Por último, resultados preliminares han mostrado que una sola aplicación de EFT modula la expresión génica en ratas naïve. El análisis de mRNA reveló que la EFT se asoció al incremento en la expresión de NSF y disminución en la expresión de Sema3b en la corteza cerebral y aumento en la expresión de Acsn5 en el hipocampo de ratas naïve (Pérez-Pérez et al., 2022). Sema3b es una proteína asociada con la atracción y repulsión axonal, lo cual sugiere que la EFT está modulando la plasticidad neuronal (Julien et al., 2005). En línea con esto, NSF es una proteína involucrada en la formación de vesículas presinápticas y el tráfico de receptores a la membrana celular. Además, mutaciones en este gen se han asociado a encefalopatías epilépticas pediátricas (Suzuki et al., 2019; Whiteheart et al., 1994). Acsn5 es una enzima que pertenece a la familia de sintetasas de coenzima A y participa en el metabolismo de los ácidos grasos (Watkins et al., 2007). Sin embargo, existe poca información sobre el rol de estas proteínas y su relevancia fisiopatológica en la epilepsia y epileptogénesis. Estos resultados preliminares sugieren que una sola administración de EFT es capaz de modular cascadas de neuroplasticidad, neuroinflamación y neurotransmisión gabaérgica y glutamatérgica. Por lo tanto, el efecto antiepileptogénico también podría estar asociado con la modulación de la expresión génica. Sin embargo, ensayos futuros deberán estudiar la expresión proteica en respuesta a la EFT y su relevancia en la epileptogénesis.

### 6.3.3. Ventana de tiempo y otros tipos de neuromodulación

Existe evidencia mostrando que otros tipos de neuroestimulación invasiva han sido efectivos inhibiendo la epileptogénesis. La estimulación del núcleo medial del tracto solitario evita la generalización de las crisis convulsivas inducidas mediante KEA en gato (Magdaleno-Madrigal et al., 2002). En la estimulación del nervio vago se reportaron resultados similares (Fernández-Guardiola et al., 1999). La administración de estimulación de baja frecuencia (LFS, *low frequency stimulation*) aplicada en el foco inmediatamente después de cada estímulo tipo *kindling* interfirió con la progresión del

KEA (Liu et al., 2013; Wang et al., 2014; Wu et al., 2008). Este mismo grupo de autores analizaron la propagación de la posdescarga y el metabolismo de la glucosa en distintas áreas durante la adquisición del KEA. Con esos datos concluyeron que el sistema límbico forma una red focal temprana de propagación de la posdescarga durante las primeras etapas del KEA (Y.Wang et al., 2014). Apoyando esta hipótesis, aplicar la LFS después de la posdescarga o cuando se presentaron crisis fase II-III no modificó la progresión del KEA e incrementó la severidad de las crisis convulsivas (Wang et al., 2014; Wu et al., 2008). De forma similar, la aplicación de EFT antes del estímulo tipo *kindling* no retrasó la epileptogénesis en gatos (Valdés-Cruz et al., 2019) y no retrasó la epileptogénesis si se administraba a partir de la fase II en ratas (Domínguez Zúñiga, 2018). Estos antecedentes muestran que existe una ventana de tiempo crítica para la aplicación de la neuromodulación.

#### 6.4. La EFT evita el aumento de la proteína GPP durante la epileptogénesis inducida por KEA

Nuestros resultados muestran que el efecto antiepileptogénico de la EFT está asociado con evitar la sobreexpresión de GPP en áreas cerebrales involucradas con la propagación de las crisis convulsivas. La EFT podría estar evitando la sobreexpresión de GPP modulando mecanismos como la hipoxia, inflamación, hipoglucemia, y/o la liberación excesiva de glutamato, discutidas en la sección 6.2.

En un modelo de hipoxia transitoria, la aplicación de estimulación por corriente directa (ECD) mejoró la latencia de escape de los ratones en el laberinto acuático de Morris. Este efecto estuvo asociado a cambios en la expresión de 180 genes involucrados en la cascada de señalización de las neurotrofinas. Entre los genes cuya expresión disminuía se encontraba NF- $\kappa$ B, proteína capaz de inducir la expresión de GPP (Lee et al., 2022; Merelli et al., 2019; Seebacher et al., 2015). La ECD también ha sido evaluada en modelos de traumatismo craneoencefálico en ratón. Bragina y colaboradores aplicaron 16 sesiones de ECD iniciando 3 semanas después de inducir el traumatismo. Los autores reportaron que la ECD atenuó el déficit motor y del aprendizaje inducidos por la lesión. El

efecto terapéutico de la ECD estaba asociado con dilatación de las arteriolas, aumentando el flujo sanguíneo y la oxigenación en la región cerebral dañada (Bragina et al., 2018).

Con respecto a la inflamación, Ethridge y colaboradores describieron que la ECD redujo la concentración de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) en cerebro de rata naïve. Interesantemente, estos efectos fueron observados incluso cuando las sesiones de ECD fueron espaciadas hasta por 3 semanas, mostrando que el efecto antiinflamatorio es de larga duración (Ethridge et al., 2022). Resultados similares reportaron Zuo y colaboradores en un modelo de estrés crónico impredecible en ratones. En este modelo de depresión, los autores reportaron que la aplicación diaria de EMT (estimulación magnética transcraneal) por 4 semanas revirtió el estado proinflamatorio inducido por el modelo, reduciendo la concentración proteica de interleucina-6 (IL-6), TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en hipocampo. Además, los autores también reportaron que la EMT disminuyó la expresión de componentes asociados a la cascada de señalización TLR4/NF- $\kappa$ B, la cual se ha demostrado es capaz de modular la expresión de GPP (Tang et al., 2022; Zuo et al., 2022). En línea con el potencial antiinflamatorio de la neuroestimulación, Dhaynaut y colaboradores mostraron que la aplicación de 20 sesiones de ECD disminuyó la activación microglial y la acumulación de proteína Tau fosforilada en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Dhaynaut et al., 2022). Por último, Rueger y colaboradores reportaron que 5 y 10 sesiones de ECD catódica fueron capaces de inducir la expresión de marcadores de respuesta inmune innata y de aumentar la proliferación de células madre neuronales en corteza cerebral, mostrando que la ECD era capaz de modular la respuesta inmune y promover la neuroprotección (Rueger et al., 2012). Con respecto a la EFT, Pérez-Pérez y colaboradores realizaron un análisis de componentes principales y de enriquecimiento de vías y reportaron que una sola sesión de EFT en ratas naïve fue capaz de modular a las vías asociadas con la neurotransmisión glutamatérgica y la respuesta inflamatoria (Pérez-Pérez et al., 2022).

La neuroestimulación es capaz de modular el metabolismo de la glucosa. La aplicación de EMT, en baja y alta frecuencia, en una sola sesión de 30 minutos fue capaz

de aumentar la captación de <sup>18</sup>F-Fluor-Fluorodeoxiglucosa (<sup>18</sup>F-FDG) en el hipocampo de ratas naïve. A partir de este hallazgo, los autores sugieren que el hipocampo juega un papel importante en los efectos inducidos por este tipo de neuroestimulación (Parthoens et al., 2014). De forma similar, la aplicación de LFS aumentó la captación de <sup>18</sup>F-FDG en amígdala, estriado, hipocampo, corteza piriforme y corteza entorrinal en ratas. Interesantemente, estas estructuras se caracterizan por presentar hipoglucemia durante las fases tempranas del *kindling* (Wang et al., 2014).

Existen evidencias mostrando que la neuroestimulación modula la transmisión glutamatérgica. Santana-Gómez y colaboradores aplicaron intensidad de corriente crecientes y cuantificaron la liberación de glutamato en hipocampo ventral de animales naïve. Los autores reportaron que existe una correlación negativa entre la intensidad de corriente de la EFT y la concentración de glutamato extracelular. Además, los autores evaluaron el efecto de la EFT en la liberación de glutamato durante el *status epilepticus*. Los resultados muestran que, a pesar de iniciar después del establecimiento del *status epilepticus*, la EFT evita la sobreliberación de glutamato y que este efecto se mantiene incluso después de suspender la neuromodulación (Santana-Gómez et al., 2015). De forma similar, Ghafouri y colaboradores evaluaron el efecto de la LFS en la plasticidad sináptica de ratas *kindled*. Los autores observaron que la aplicación de LFS disminuyó la excitabilidad pues fue capaz de inhibir la reducción en el umbral de excitación glutamatérgica y evitó la sobreexpresión de la subunidad NR2A (Ghafouri et al., 2019).

Estos antecedentes muestran que la neuromodulación es capaz de evitar la sobreexpresión de GPP modulando mecanismos como la hipoxia, inflamación, hipoglucemia, y/o la liberación excesiva de glutamato. Sin embargo, a pesar de que el mecanismo de acción de los distintos tipos de neuromodulación es similar, se requieren futuros ensayos para evaluar el efecto de la EFT sobre cada uno de los mecanismos discutidos.

## 7. Conclusiones

- 1) La epileptogénesis inducida por KEA está asociada con incrementos progresivos en la expresión de GPP. Estos cambios son dependientes de la estructura y severidad de las crisis convulsivas.
- 2) El efecto antiepileptogénico de la EFT está asociado con la intensidad del campo eléctrico que se induce en las estructuras subcorticales.
- 3) Evitar la sobreexpresión de GPP durante la epileptogénesis está asociado con el efecto antiepileptogénico de la EFT.

Estos hallazgos son prometedores pues la EFT representa una novedosa estrategia de neuromodulación no invasiva en pacientes con alto riesgo de epileptogénesis. Futuros estudios deberán ser realizados en vistas de la aplicación clínica.

## 8. Perspectivas

1. Evaluar la expresión neuronal de GPP durante la epileptogénesis inducida por KEA. La hipótesis de la epileptogénesis inducida por la sobreexpresión de GPP está basada en la expresión neuronal de dicha proteína. Sin embargo, nuestros experimentos fueron realizados en tejido completo por lo que futuros ensayos deberán enfocarse en analizar la expresión neuronal de GPP durante la progresión del KEA.
2. Investigar si la sobreexpresión de GPP facilita la epileptogénesis. La expresión neuronal de GPP se asocia a disminución del potencial de membrana en reposo de las neuronas, promoviendo un estado de hiperexcitabilidad. Por lo tanto, se propone analizar cambios en la excitabilidad del tejido en relación con la expresión de GPP inducida por el KEA.
3. Determinar los parámetros óptimos de la EFT. Los parámetros de estimulación de la EFT en este proyecto fueron determinados con base en los hallazgos reportados en gatos. Sin embargo, se desconocen los parámetros óptimos para inducir los efectos anticonvulsivos y antiepileptogénicos. Se sugiere realizar ensayos para determinar la intensidad y duración óptima de la EFT, así como investigar la duración de sus efectos.
4. Analizar la expresión periférica de GPP. Existe evidencia mostrando que la actividad convulsiva es capaz de inducir la sobreexpresión periférica de GPP. En cardiomiocitos, la sobreexpresión de dicha proteína induce alargamiento del intervalo QT y arritmias, por lo que ha sido asociada con la muerte súbita espontánea del paciente con epilepsia (SUDEP). Con base en nuestros hallazgos, es posible que la sobreexpresión de GPP en tejido cardíaco ocurra desde la primera crisis convulsiva y esté asociada con la epileptogénesis.

5. Aplicación clínica de la EFT. El efecto antiepileptogénico de la EFT en gatos y ratas está asociado con la intensidad del campo eléctrico que la estimulación induce en estructuras subcorticales. Con base en estos antecedentes, la EFT podría aplicarse en pacientes con alto riesgo de desarrollar epileptogénesis.
6. La EFT evita la sobreexpresión de GPP. El efecto antiepileptogénico de la EFT está asociado con evitar la sobreexpresión de GPP en estructuras cerebrales involucradas en la propagación de las crisis convulsivas. De forma similar, Pérez-Pérez y colaboradores describieron que la EFT evita la sobreexpresión de GPP inducida por una crisis convulsiva generalizada y restaura la respuesta a fármacos anticrisis. Por lo tanto, la aplicación repetida de EFT debería ser evaluada en modelos de epilepsia farmacorresistente en vista de su aplicación clínica.
7. Investigar si existen efectos adversos inducidos por la aplicación de EFT crónica. Existen estudios mostrando que la EFT es segura. Sin embargo, estos estudios aplicaron la EFT de forma aguda (5 días seguidos) o de forma crónica pero intermitente (5 aplicaciones en 1 mes). Por lo tanto, futuros estudios deberán ser realizados para determinar la seguridad de la EFT como tratamiento crónico.
8. La EFT ha mostrado efectos anticonvulsivos en modelos de crisis severas y *status epilepticus*. Además, los electrodos concéntricos tripolares son capaces de registrar la actividad electroencefalográfica (W. G. Besio et al., 2007b; W. Besio & Liu, 2011). Por lo tanto, la EFT podría ser utilizada para aplicar un paradigma de estimulación de asa cerrada. Este tipo de paradigma ha mostrado efectos benéficos tanto en modelos animales de epilepsia como en pacientes con epilepsia farmacorresistente (Kang et al., 2022; Parastarfeizabadi & Kouzani, 2017; Sabersky et al., 2018). Considerando las ventajas de la EFT con respecto a otros tipos de neuromodulación, se debe estudiar el efecto de la EFT en modelos de crisis espontáneas.

## 9. Referencias

- Ahmadirad, N., Bakhtiarzadeh, F., Zare, M., Ghasemi, Z., Sadeghin, A., Dehghan, S., & Joghataei, M. T. (2023). Neurostimulation as a Putative Method for Treatment of Drug-Resistant Epilepsy in Patient and Animal Models of Epilepsy. *Basic and Clinical Neuroscience*, 14(1). <https://doi.org/10.32598/bcn.2022.2360.4>
- Andrioli, A., Alonso-Nanclares, L., Arellano, J. I., & DeFelipe, J. (2007). Quantitative analysis of parvalbumin-immunoreactive cells in the human epileptic hippocampus. *Neuroscience*, 149(1), 131-143. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.07.029>
- Aronica, E., Gorter, J. A., Ramkema, M., Redeker, S., Özbas-Gerçerer, F., Van Vliet, E. A., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Van Der Valk, P., Baayen, J. C., & Troost, D. (2004). Expression and Cellular Distribution of Multidrug Resistance-related Proteins in the Hippocampus of Patients with Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia*, 45(5), 441-451. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.57703.x>
- Aronica, E., Sisodiya, S. M., & Gorter, J. A. (2012). Cerebral expression of drug transporters in epilepsy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(10), 919-929. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.008>
- Asadi-Pooya, A. A., Razavizadegan, S. M. A., Abdi-Ardekani, A., & Sperling, M. R. (2013). Adjunctive use of verapamil in patients with refractory temporal lobe epilepsy: A pilot study. *Epilepsy and Behavior*, 29(1), 150-154. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2013.07.006>
- Auzmendi, J., Orozco-Suárez, S., Bañuelos-Cabrera, I., Eva González-Trujano, M., Calixto González, E., Rocha, L., & Lazarowski, A. (2013). P-Glycoprotein Contributes to Cell Membrane Depolarization of Hippocampus and Neocortex in a Model of Repetitive Seizures Induced by Pentylentetrazole in Rats. *Current Pharmaceutical Design*, 19. <https://doi.org/10.2174/1381612811319380006>
- Bankstahl, J. P., Hoffmann, K., Bethmann, K., & Löscher, W. (2008). Glutamate is critically involved in seizure-induced overexpression of P-glycoprotein in the brain. *Neuropharmacology*, 54(6), 1006-1016. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.02.008>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs. *Cell*, 116(2), 281-297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Bateman, L. M., Li, C. S., & Seyal, M. (2008). Ictal hypoxemia in localization-related epilepsy: Analysis of incidence, severity and risk factors. *Brain*, 131(12), 3239-3245. <https://doi.org/10.1093/brain/awn277>
- Batten, S. R., Matveeva, E. A., Whiteheart, S. W., Vanaman, T. C., Gerhardt, G. A., & Slevin, J. T. (2017). Linking kindling to increased glutamate release in the dentate gyrus of the hippocampus through the STXBP5/tomosyn-1 gene. *Brain and Behavior*, 7(9). <https://doi.org/10.1002/brb3.795>



- Bauer, B., Hartz, A. M. S., & Miller, D. S. (2007). Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Endothelin-1 Increase P-Glycoprotein Expression and Transport Activity at the Blood-Brain Barrier. *Molecular Pharmacology*, 71(3), 667-675. <https://doi.org/10.1124/mol.106.029512>
- Bauer, B., Hartz, A. M. S., Pekcec, A., Toellner, K., Miller, D. S., & Potschka, H. (2008). Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling. *Molecular Pharmacology*, 73(5), 1444-1453. <https://doi.org/10.1124/mol.107.041210>
- Beaulieu, É., Demeule, M., Ghitescu, L., & Béliveau, R. (1997). P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain. *Biochemical Journal*, 326(2), 539-544. <https://doi.org/10.1042/bj3260539>
- 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 & Behavior*, 28(3), 432-436. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2013.06.021>
- Besio, W. G., Koka, K., & Cole, A. J. (2007a). Effects of noninvasive transcutaneous electrical stimulation via concentric ring electrodes on pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Epilepsia*, 48(12), 2273-2279. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01202.x>
- Besio, W. G., Koka, K., & Cole, A. J. (2007b). Effects of noninvasive transcutaneous electrical stimulation via concentric ring electrodes on pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Epilepsia*, 48(12), 2273-2279. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01202.x>
- Besio, W., Hadidi, R., Makeyev, O., Luna-Munguía, H., & Rocha, L. (2011). Electric Fields in Hippocampus Due to Transcranial Focal Electrical Stimulation via Concentric Ring Electrodes. *33rd Annual International Conference of the IEEE EMBS*, 5488-5491. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2011.6091400>
- Besio, W., & Liu, X. (2011). Transcutaneous focal electrical stimulation via concentric ring electrodes reduces synchrony induced by pentilenetetrazole in beta and gamma bands in rats. *International Journal of Neural Systems*, 21(2), 139-149. <https://doi.org/10.1142/S0129065711002729>
- Besio, W., Sharma, V., & Spaulding, J. (2010). The effects of concentric ring electrode electrical stimulation on rat skin. *Annals of Biomedical Engineering*, 38(3), 1111-1118. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Bikson, M., Lian, J., Hahn, P. J., Stacey, W. C., Sciortino, C., & Durand, D. M. (2001). Suppression of epileptiform activity by high frequency sinusoidal fields in rat hippocampal slices. *The Journal of Physiology*, 531(1), 181-191. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0181j.x>
- Blumenfeld, H., Rivera, M., Vasquez, J. G., Shah, A., Ismail, D., Enev, M., & Zaveri, H. P. (2007). Neocortical and thalamic spread of amygdala kindled seizures. *Epilepsia*, 48(2), 254-262. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00934.x>
- Bragina, O. A., Lara, D. A., Nemoto, E. M., Shuttleworth, C. W., Semyachkina-Glushkovskaya, O. V., & Bragin, D. E. (2018). Increases in microvascular perfusion and tissue oxygenation

- via vasodilatation after anodal transcranial direct current stimulation in the healthy and traumatized mouse brain. En *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1072, pp. 27-31). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-91287-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-91287-5_5)
- Brandt, C., Heile, A., Potschka, H., Stoehr, T., & Löscher, W. (2006). Effects of the novel antiepileptic drug lacosamide on the development of amygdala kindling in rats. *Epilepsia*, 47(11), 1803-1809. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00818.x>
- Caltana, L., Merelli, A., Lazarowski, A., & Brusco, A. (2009). Neuronal and Glial Alterations Due to Focal Cortical Hypoxia Induced by Direct Cobalt Chloride (CoCl<sub>2</sub>) Brain Injection. *Neurotoxicity Research*, 15(4), 348-358. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9038-9>
- Cavazos, J. E., Das, I., & Sutula, T. P. (1994). Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: Evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures. *Journal of Neuroscience*, 14(5 II), 3106-3121. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-05-03106.1994>
- Cavazos, J. E., Golarai, G., & Sutula, T. P. (1991). Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: Time course of development, progression, and permanence. *The Journal of Neuroscience*, 11(9), 2795-2803. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.11-09-02795.1991>
- Cavazos, J. E., & Sutula, T. P. (1990). Progressive neuronal loss induced by kindling: A possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. *Brain Research*, 527(1), 1-6. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91096-J](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91096-J)
- Corcoran, M. E., Urstad, H., Mccaughran, J. A., & Wada, J. A. (1975). Frontal Lobe and Kindling in the Rat. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques*, 2(4), 501-508. <https://doi.org/10.1017/S0317167100020643>
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J. P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J. L., Melamed, M. R., & Bertino, J. R. (1989). Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 695-698.
- Czornyj, L., Auzmendi, J., & Lazarowski, A. (2021). Transporter hypothesis in pharmacoresistant epilepsies Is it at the central or peripheral level? *Epilepsia Open*, August, 1-13. <https://doi.org/10.1002/epi4.12537>
- Dalsgaard, M. K., Madsen, F. F., Secher, N. H., Laursen, H., & Quistorff, B. (2007). High glycogen levels in the hippocampus of patients with epilepsy. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(6), 1137-1141. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600426>
- Das, A., Wallace, G. C., Holmes, C., McDowell, M. L., Smith, J. A., Marshall, J. D., Bonilha, L., Edwards, J. C., Glazier, S. S., Ray, S. K., & Banik, N. L. (2012). Hippocampal tissue of patients with refractory temporal lobe epilepsy is associated with astrocyte activation, inflammation, and altered expression of channels and receptors. *Neuroscience*, 220, 237-246. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.06.002>
- Dhaynaut, M., Sprugnoli, G., Cappon, D., Macone, J., Sanchez, J. S., Normandin, M. D., Guehl, N. J., Koch, G., Paciorek, R., Connor, A., Press, D., Johnson, K., Pascual-Leone, A., El Fakhri, G., & Santarnecchi, E. (2022). Impact of 40Hz Transcranial Alternating Current Stimulation on Cerebral Tau Burden in Patients with Alzheimer's Disease: A Case Series. *Journal of Alzheimer's Disease*, 85(4), 1667-1676. <https://doi.org/10.3233/JAD-215072>

- Dienel, G. A., Gillinder, L., McGonigal, A., & Borges, K. (2023). Potential new roles for glycogen in epilepsy. En *Epilepsia* (Vol. 64, Número 1, pp. 29-53). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/epi.17412>
- DiNuzzo, M., Giove, F., Maraviglia, B., & Mangia, S. (2017). Computational Flux Balance Analysis Predicts that Stimulation of Energy Metabolism in Astrocytes and their Metabolic Interactions with Neurons Depend on Uptake of K<sup>+</sup> Rather than Glutamate. *Neurochemical Research*, 42(1), 202-216. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2048-0>
- Domínguez Zúñiga, P. (2018). *Efecto de la estimulación eléctrica transcraneal focal sobre la epileptogénesis en ratas de la cepa Wistar* [Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2018/junio/0774976/0774976.pdf>
- During, M. J., & Spencer, D. D. (1993). Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *The Lancet*, 341(8861), 1607-1610. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90754-5](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90754-5)
- Eacker, S. M., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2009). Understanding microRNAs in neurodegeneration. En *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 10, Número 12, pp. 837-841). <https://doi.org/10.1038/nrn2726>
- Enrique, A., Goicoechea, S., Castaño, R., Taborda, F., Rocha, L., Orozco, S., Girardi, E., & Bruno Blanch, L. (2017). New model of pharmacoresistant seizures induced by 3-mercaptopropionic acid in mice. *Epilepsy Research*, 129, 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2016.10.012>
- Ethridge, V. T., Gargas, N. M., Sonner, M. J., Moore, R. J., Romer, S. H., Hatcher-Solis, C., & Rohan, J. G. (2022). Effects of transcranial direct current stimulation on brain cytokine levels in rats. *Frontiers in Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.1069484>
- Farrell, J. S., Colangeli, R., Wolff, M. D., Wall, A. K., Phillips, T. J., George, A., Federico, P., & Teskey, G. C. (2017). Postictal hypoperfusion/hypoxia provides the foundation for a unified theory of seizure-induced brain abnormalities and behavioral dysfunction. *Epilepsia*, 58(9), 1493-1501. <https://doi.org/10.1111/epi.13827>
- Feldmann, M., Asselin, M. C., Liu, J., Wang, S., McMahon, A., Anton-Rodriguez, J., Walker, M., Symms, M., Brown, G., Hinz, R., Matthews, J., Bauer, M., Langer, O., Thom, M., Jones, T., Vollmar, C., Duncan, J. S., Sisodiya, S. M., & Koepp, M. J. (2013). P-glycoprotein expression and function in patients with temporal lobe epilepsy: A case-control study. *The Lancet Neurology*, 12(8), 777-785. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70109-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70109-1)
- Fernández-Guardiola, A., Cervantes, A. M., De Gortari, P., & Fernández-Mas, R. (1996). La activación progresiva del sistema límbico (Kindling): Un modelo de aprendizaje y plasticidad cerebral. En *Salud Mental* (Vol. 19, Número 3, pp. 22-29).
- Fernández-Guardiola, A., Martínez, A., Valdés-Cruz, A., Magdaleno-Madrigal, V. M., Martínez, D., & Fernández-Mas, R. (1999). Vagus nerve prolonged stimulation in cats: Effects on epileptogenesis (amygdala electrical kindling): Behavioral and electrographic changes. *Epilepsia*, 40(7), 822-829. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1999.tb00787.x>
- Fisher, P. D., Sperber, E. F., & Moshé, S. L. (1998). Hippocampal sclerosis revisited. *Brain and Development*, 20(8), 563-573. [https://doi.org/10.1016/S0387-7604\(98\)00069-2](https://doi.org/10.1016/S0387-7604(98)00069-2)

- Fonseca-Barriendos, D., Pérez-Pérez, D., Fuentes-Mejía, M., Orozco-Suárez, S., Alonso-Vanegas, M., Martínez-Juárez, I. E., Guevara-Guzmán, R., Castañeda-Cabral, J. L., & Rocha, L. (2022). Protein expression of P-glycoprotein in neocortex from patients with frontal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, 181(February). <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2022.106892>
- Francis, J. T., Gluckman, B. J., & Schiff, S. J. (2003). *Behavioral/Systems/Cognitive Sensitivity of Neurons to Weak Electric Fields*.
- Ghafouri, S., Fathollahi, Y., Semnanian, S., Shojaei, A., Asgari, A., Amini, A. E., & Mirnajafi-Zadeh, J. (2019). Deep brain stimulation restores the glutamatergic and GABAergic synaptic transmission and plasticity to normal levels in kindled rats. *PLoS ONE*, 14(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224834>
- Ghosh, R., Gilda, J. E., & Gomes, A. V. (2014). The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. En *Expert Review of Proteomics* (Vol. 11, Número 5, pp. 549-560). Expert Reviews Ltd. <https://doi.org/10.1586/14789450.2014.939635>
- Goddard, G. V., McIntyre, D. C., & Leech, C. K. (1969). A Permanent Change in Brain Function Resulting from Daily Electrical Stimulation. *Experimental Neurology*, 25(2), 295-330.
- Golden, P. L., & Pardridge, W. M. (1999). P-glycoprotein on astrocyte foot processes of unfixed isolated human brain capillaries. *Brain Research*, 819(1-2), 143-146. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)01305-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)01305-5)
- Goodsell, D. S. (2010). P-glycoprotein. *RCSB Protein Data Bank*. [https://doi.org/10.2210/rcsb\\_pdb/mom\\_2010\\_3](https://doi.org/10.2210/rcsb_pdb/mom_2010_3)
- Gurung, P., Nene, Y., & Sivaraman, M. (2020). Vagus Nerve Stimulator (VNS)-induced Severe Obstructive Sleep Apnea Which Resolved After the VNS Was Turned Off. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.6901>
- Hammad, S., Mabondzo, A., Hamoudi, R., & Harati, R. (2022). Regulation of P-glycoprotein by miR-27a-3p at the Brain Endothelial Barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 111(5), 1470-1479. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.10.021>
- Hewapathirane, D. S., & Burnham, W. M. I. (2005). Propagation of amygdala-kindled seizures to the hippocampus in the rat: Electroencephalographic features and behavioural correlates. *Neuroscience Research*, 53(4), 369-375. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.08.007>
- Hirsch, E., Danober, L., Simler, S., De Vasconcelos, A. P., Maton, B., Nehlig, A., Marescaux, C., & Vergnes, M. (1997). The amygdala is critical for seizure propagation from brainstem to forebrain. *Neuroscience*, 77(4), 975-984. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00503-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00503-9)
- Hoffman, M. M., Wei, L.-Y., & Roepe, P. D. (1996). Are altered pHi and membrane potential in hu MDR 1 transfectants sufficient to cause MDR protein-mediated multidrug resistance? *Journal of General Physiology*, 108(4), 295-313. <https://doi.org/10.1085/jgp.108.4.295>
- Hofmann, L., Ebert, M., Tass, P. A., & Hauptmann, C. (2011). Modified pulse shapes for effective neural stimulation. *Frontiers in Neuroengineering*, SEPTEMBER, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fneng.2011.00009>

- Jensen, A. L., & Durand, D. M. (2009). High frequency stimulation can block axonal conduction. *Experimental Neurology*, 220(1), 57-70. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.07.023>
- Jimenez-Mateos, E. M., Bray, I., Sanz-Rodriguez, A., Engel, T., McKiernan, R. C., Mouri, G., Tanaka, K., Sano, T., Saugstad, J. A., Simon, R. P., Stallings, R. L., & Henshall, D. C. (2011). MiRNA expression profile after status epilepticus and hippocampal neuroprotection by targeting miR-132. *American Journal of Pathology*, 179(5), 2519-2532. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.07.036>
- Julien, F., Bechara, A., Fiore, R., Nawabi, H., Zhou, H., Hoyo-Becerra, C., Bozon, M., Rougon, G., Grumet, M., Püschel, A. W., Sanes, J. R., & Castellani, V. (2005). Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron*, 48(1), 63-75. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.033>
- Kaewpila, S., Venkataraman, S., Buettner, G. R., & Oberley, L. W. (2008). Manganese superoxide dismutase modulates hypoxia-inducible factor-1A induction via superoxide. *Cancer Research*, 68(8), 2781-2788. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2635>
- Kajiwara, R., Takashima, I., Mimura, Y., Witter, M. P., & Iijima, T. (2003). Amygdala input promotes spread of excitatory neural activity from perirhinal cortex to the entorhinal-hippocampal circuit. *Journal of Neurophysiology*, 89(4), 2176-2184. <https://doi.org/10.1152/jn.01033.2002>
- Kamphuis, W., Wadman, W. J., Buijs, R. M., & Lopes da Silva, F. H. (1986). Decrease in number of hippocampal gamma-aminobutyric acid (GABA) immunoreactive cells in the rat kindling model of epilepsy. *Experimental Brain Research*, 64, 491-495.
- Kang, W., Ju, C., Joo, J., Lee, J., Shon, Y. M., & Park, S. M. (2022). Closed-loop direct control of seizure focus in a rodent model of temporal lobe epilepsy via localized electric fields applied sequentially. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35540-7>
- Karthika, C., Sureshkumar, R., Zehravi, M., Akter, R., Ali, F., Ramproshad, S., Mondal, B., Tagde, P., Ahmed, Z., Khan, F. S., Rahman, M. H., & Cavalu, S. (2022). Multidrug Resistance of Cancer Cells and the Vital Role of P-Glycoprotein. En *Life* (Vol. 12, Número 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/life12060897>
- Kaura, S., Bradford, H. F., Young, A. M. J., Croucher, M. J., & Hughes, P. D. (1995). Effect of Amygdaloid Kindling on the Content and Release of Amino Acids from the Amygdaloid Complex: In Vivo and In Vitro Studies. *Journal of Neurochemistry*, 65(3), 1240-1249. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65031240.x>
- Kghr, G., Koninck, Y. De, & Mody, L. (1993). Properties of NMDA Receptor Channels in Neurons Acutely Isolated from Epileptic (Kindled) Rats. En *The Journal of Neuroscience* (Vol. 73, Número 8).
- Kim, R. B., Fromm, M. F., Wandel, C., Leake, B., Wood, A. J. J., Roden, D. M., & Wilkinson, G. R. (1998). The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *Journal of Clinical Investigation*, 101(2), 289-294. <https://doi.org/10.1172/JCI1269>

- Lacuey, N., Zonjy, B., Hampson, J. P., Rani, M. R. S., Zaremba, A., Sainju, R. K., Gehlbach, B. K., Schuele, S., Friedman, D., Devinsky, O., Nei, M., Harper, R. M., Allen, L., Diehl, B., Millichap, J. J., Bateman, L., Granner, M. A., Dragon, D. N., Richerson, G. B., & Lhatoo, S. D. (2018). The incidence and significance of periictal apnea in epileptic seizures. *Epilepsia*, *59*(3), 573-582. <https://doi.org/10.1111/epi.14006>
- Lazarowski, A., Czornyj, L., Lubienieki, F., Girardi, E., Vazquez, S., & D'Giano, C. (2007). ABC transporters during epilepsy and mechanisms underlying multidrug resistance in refractory epilepsy. *Epilepsia*, *48*(SUPPL. 5), 140-149. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01302.x>
- Lazarowski, A., Ramos, A. J., García-Rivello, H., Brasco, A., & Girardi, E. (2004). Neuronal and Glial Expression of the Multidrug Resistance Gene Product in an Experimental Epilepsy Model. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *24*(1), 77-85. <https://doi.org/10.1023/B:CEMN.0000012726.43842.d2>
- Lazarowski, A., Sevlever, G., Taratuto, A., Massaro, M., & Rabinowicz, A. (1999). Tuberous sclerosis associated with MDR1 gene expression and drug-resistant epilepsy. *Pediatric Neurology*, *21*(4), 731-734. [https://doi.org/10.1016/S0887-8994\(99\)00074-0](https://doi.org/10.1016/S0887-8994(99)00074-0)
- Lee, G., Schlichter, L., Bendayan, M., & Bendayan, R. (2001). Functional expression of P-glycoprotein in rat brain microglia. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *299*(1), 204-212.
- Lee, J. W., Jeong, W. H., Kim, E. J., Choi, I., & Song, M. K. (2022). Regulation of Genes Related to Cognition after tDCS in an Intermittent Hypoxic Brain Injury Rat Model. *Genes*, *13*(10). <https://doi.org/10.3390/genes13101824>
- Lim, J. C., Kania, K. D., Wijesuriya, H., Chawla, S., Sethi, J. K., Pulaski, L., Romero, I. A., Couraud, P. O., Weksler, B. B., Hladky, S. B., & Barrand, M. A. (2008). Activation of  $\beta$ -catenin signalling by GSK-3 inhibition increases p-glycoprotein expression in brain endothelial cells Europe PMC Funders Group. *J Neurochem*, *106*(4), 1855-1865. <https://doi.org/10.1111/j>
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S., & Johnson, J. M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, *433*(7027), 769-773. <https://doi.org/10.1038/nature03315>
- Liu, Y., Wang, Y., Xu, Z., Xu, C., Ying, X., Wang, S., Zhang, S., Xiao, B., & Chen, Z. (2013). Consecutive 15 min is necessary for focal low frequency stimulation to inhibit amygdaloid-kindling seizures in rats. *Epilepsy Research*, *106*, 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2013.06.009>
- Löscher, W., & Brandt, C. (2010). Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: Experimental approaches and translational research. *Pharmacological Reviews*, *62*(4), 668-700. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003046>
- Löscher, W., Hönack, D., & Rundfeldt, C. (1997). Antiepileptogenic effects of the novel anticonvulsant levetiracetam (ucb L059) in the kindling model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *284*(2), 474-479.

- Löscher, W., & Potschka, H. (2002). Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(1), 7-14. <https://doi.org/10.1124/jpet.301.1.7>
- Löscher, W., & Potschka, H. (2005). Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Neuroscience*, 6(8), 591-602. <https://doi.org/10.1038/nrn1728>
- Löscher, W., & Rundfeldt, C. (1991). Kindling as a model of drug-resistant partial epilepsy: Selection of phenytoin-resistant and nonresistant rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 258(2), 483-489.
- Löscher, W., & Schmidt, D. (1988). Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Research*, 2(3), 145-181. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(88\)90054-X](https://doi.org/10.1016/0920-1211(88)90054-X)
- Luby, M. D., Makeyev, O., & Besio, W. (2014). Chronic Transcranial Focal Stimulation from Tripolar Concentric Ring Electrodes does not Disrupt Memory Formation in Rats. *Annual Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 6139-6142.
- 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(4), 807-814. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.05.027>
- Luz, J. G., Wei, L.-Y., Basu, S., & Roepe, P. D. (1994). Transfection of mu MDR 1 inhibits Na<sup>+</sup> - Independent Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub> exchange in chinese hamster ovary cells. *American Chemical Society*, 33(23), 7239-7248. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(87\)51004-7](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(87)51004-7)
- Ma, X., Li, X., Wang, W., Zhang, M., Yang, B., & Miao, Z. (2022). Phosphatidylserine, inflammation, and central nervous system diseases. En *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.975176>
- Magdaleno-Madrigal, V. M., Valdés-Cruz, A., Martínez-Vargas, D., Martínez, A., Almazán, S., Fernández-Mas, R., & Fernández-Guardiola, A. (2002). Effect of electrical stimulation of the nucleus of the solitary tract on the development of electrical amygdaloid kindling in the cat. *Epilepsia*, 43(9), 964-969. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2002.05702.x>
- Marchi, N., Hallene, K. L., Kight, K. M., Cucullo, L., Moddel, G., Bingaman, W., Dini, G., Vezzani, A., & Janigro, D. (2004). Significance of MDR1 and multiple drug resistance in refractory human epileptic brain. *BMC Medicine*, 2, 1-10. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-2-37>
- Matsui, M., & Corey, D. R. (2017). Non-coding RNAs as drug targets. En *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 16, Número 3, pp. 167-179). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.117>
- McNamara, J. O. (1989). Development of New Pharmacological Agents for Epilepsy: Lessons from the Kindling Model. *Epilepsia*, 30, S13-S18. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1989.tb05809.x>
- Merelli, A., Ramos, A. J., Lazarowski, A., & Auzmendi, J. (2019). Convulsive stress mimics brain hypoxia and promotes the P-glycoprotein (P-gp) and erythropoietin receptor

- overexpression. Recombinant human erythropoietin effect on P-gp activity. *Frontiers in Neuroscience*, 13(JUL), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00750>
- Minamoto, Y., Itano, T., Tokuda, M., Matsui, H., Janjua, N. A., Hosokawa, K., Okada, Y., Murakami, T. H., Negi, T., & Hatase, O. (1992). In vivo microdialysis of amino acid neurotransmitters in the hippocampus in amygdaloid kindled rat. *Brain Research*, 573(2), 345-348. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90786-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90786-9)
- Mody, I. (1993). The Molecular Basis of Kindling. *Brain Pathology*, 3(4), 395-403. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1993.tb00767.x>
- Mody, I., & Heinemann, U. (1983). NMDA receptors of dentate gyrus granule cells participate in synaptic transmission following kindling. En 10. McCarren. M. & Alger, B. E. 1. *Neurophysiol* (Vol. 334).
- Mody, I., & Heinemann, U. (1987). NMDA receptors of dentate gyrus granule cells participate in synaptic transmission following kindling. *Nature*, 326, 701-704.
- Mody, I., Stanton, P. K., & Heinemann, U. (1988). Activation of N-methyl-D-aspartate receptors parallels changes in cellular and synaptic properties of dentate gyrus granule cells after kindling. *Journal of Neurophysiology*, 59(3), 1033-1054. <https://doi.org/10.1152/jn.1988.59.3.1033>
- Mori, N., & Wada, J. A. (1987). Bidirectional transfer between kindling induced by excitatory amino acids and electrical stimulation. En *Brain Research* (Vol. 425).
- Moseley, B. D., Nickels, K., Britton, J., & Wirrell, E. (2010). How common is ictal hypoxemia and bradycardia in children with partial complex and generalized convulsive seizures? *Epilepsia*, 51(7), 1219-1224. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02490.x>
- Mucio-Ramírez, S., & Makeyev, O. (2017). Safety of the transcranial focal electrical stimulation via tripolar concentric ring electrodes for hippocampal CA3 subregion neurons in rats. *Journal of Healthcare Engineering*, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2017/4302810>
- Ng, P. R., Bush, A., Vissani, M., McIntyre, C. C., & Richardson, R. M. (2023). Biophysical Principles and Computational Modeling of Deep Brain Stimulation. En *Neuromodulation*. International Neuromodulation Society. <https://doi.org/10.1016/j.neurom.2023.04.471>
- Omran, A., Peng, J., Zhang, C., Xiang, Q. L., Xue, J., Gan, N., Kong, H., & Yin, F. (2012). Interleukin-1 $\beta$  and microRNA-146a in an immature rat model and children with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 53(7), 1215-1224. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03540.x>
- Palencia, G., Rubio, C., Custodio-Ramirez, V., Paz, C., & Sotelo, J. (2011). Strong anticonvulsant effect of thalidomide on amygdaloid kindling. *Epilepsy Research*, 95(3), 263-269. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.04.008>
- Páramo, B., Hernández-Fonseca, K., Estrada-Sánchez, A. M., Jiménez, N., Hernández-Cruz, A., & Massieu, L. (2010). Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, 167(4), 1057-1069. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.074>



- Parastarfeizabadi, M., & Kouzani, A. Z. (2017). Advances in closed-loop deep brain stimulation devices. En *Journal of neuroengineering and rehabilitation* (Vol. 14, Número 1, p. 79). <https://doi.org/10.1186/s12984-017-0295-1>
- Parthoens, J., Verhaeghe, J., Wyckhuys, T., Stroobants, S., & Staelens, S. (2014). Small-animal repetitive transcranial magnetic stimulation combined with [18F]-FDG microPET to quantify the neuromodulation effect in the rat brain. *Neuroscience*, 275, 436-443. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.06.042>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2006). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th ed.). Academic Press.
- Pérez-Pérez, D., Castañeda-Cabral, J. L., Orozco-Suárez, S., Sotelo, J., Besio, W., & Rocha, L. (2021). Noninvasive transcranial focal stimulation affects the convulsive seizure-induced P-glycoprotein expression and function in rats. *Epilepsy and Behavior*, 115. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.107659>
- Pérez-Pérez, D., Feria-Romero, I., Besio, W., Rocha, L., Bautista-Orozco, L., & Orozco-Suárez, S. (2022). Transcranial Focal Stimulation modifies the genetic expression in the cerebral cortex and the hippocampus of healthy rats. *Research Square*. <https://doi.org/https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1511681/v1>
- Peterchev, A. V., Wagner, T. A., Miranda, P. C., Nitsche, M. A., Paulus, W., Lisanby, S. H., Pascual-Leone, A., & Bikson, M. (2012). Fundamentals of transcranial electric and magnetic stimulation dose: Definition, selection, and reporting practices. *Brain Stimulation*, 5(4), 435-453. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2011.10.001>
- Peterson, D. W., Collins, J. F., & Bradford, H. F. (1983). The kindled amygdala model of epilepsy: anticonvulsant action of amino acid antagonists. En *Brain Research* (Vol. 275).
- Pitkänen, A., & Engel, J. J. (2014). Past and Present Definitions of Epileptogenesis and Its Biomarkers. *Neurotherapeutics*, 11(2), 231-241. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0257-2>
- Pitkänen, A., Lukasiuk, K., Dudek, F. E., & Staley, K. J. (2015). Epileptogenesis. En G. L. Holmes & J. L. Noebels (Eds.), *Journal of Chemical Information and Modeling* (Número 9). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Pittau, F., Fahoum, F., Zemann, R., Dubeau, F., & Gotman, J. (2013). Negative BOLD response to interictal epileptic discharges in focal epilepsy. *Brain Topography*, 26(4), 627-640. <https://doi.org/10.1007/s10548-013-0302-1>
- Ponisio, M. R., Zempel, J. M., Day, B. K., Eisenman, L. N., Miller-Thomas, M. M., Smyth, M. D., & Hogan, R. E. (2021). The role of SPECT and PET in epilepsy. En *American Journal of Roentgenology* (Vol. 216, Número 3, pp. 759-768). American Roentgen Ray Society. <https://doi.org/10.2214/AJR.20.23336>
- Potschka, H., Fedrowitz, M., & Löscher, W. (2001). P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepine in the brain. *NeuroReport*, 12(16), 3557-3560. <https://doi.org/10.1097/00001756-200111160-00037>

- Potschka, H., Fedrowitz, M., & Löscher, W. (2002). P-Glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital, lamotrigine, and felbamate at the blood-brain barrier: Evidence from microdialysis experiments in rats. *Neuroscience Letters*, *327*(3), 173-176. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00423-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00423-8)
- Potschka, H., & Löscher, W. (2001). In vivo evidence for P-glycoprotein-mediated transport of phenytoin at the blood-brain barrier of rats. *Epilepsia*, *42*(10), 1231-1240. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.01901.x>
- Racine, R. J. (1972). Modification of seizures activity by electrical stimulation: Motor Seizure. *Electroencephalography and clinical Neurophysiology*, *32*, 281-294.
- Rahman, B., Kussmaul, L., Hamprecht, B., & Dringen, R. (2000). Glycogen is mobilized during the disposal of peroxides by cultured astroglial cells from rat brain. *Neuroscience Letters*, *290*(3), 169-172. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01369-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01369-0)
- Rao, V. V., Dahlheimer, J. L., Bardgett, M. E., Snyder, A. Z., Finch, R. A., Sartorelli, A. C., & Piwnica-Worms, D. (1999). Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(7), 3900-3905. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3900>
- Regesta, G., & Tanganelli, P. (1999). Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. *Epilepsy Research*, *34*, 109-122.
- Rice, A. C., & DeLorenzo, R. J. (1998). Kindling 5. En M. E. Corcoran & S. L. Moshé (Eds.), *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* (Vol. 48, Número 5). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5375-5>
- Rizzi, M., Caccia, S., Guiso, G., Richichi, C., Gorter, J. A., Aronica, E., Aliprandi, M., Bagnati, R., Fanelli, R., D'Incalci, M., Samanin, R., & Vezzani, A. (2002). Limbic seizures induce P-glycoprotein in rodent brain: Functional implications for pharmacoresistance. *Journal of Neuroscience*, *22*(14), 5833-5839. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-14-05833.2002>
- Rocha, L. (2013). Interaction between electrical modulation of the brain and pharmacotherapy to control pharmacoresistant epilepsy. *Pharmacology and Therapeutics*, *138*(2), 211-228. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.009>
- Rocha, L., Ackermann, R. F., & Engel, J. J. (1996). Effects of chronic morphine pretreatment on amygdaloid kindling development, postictal seizure and suppression and benzodiazepine receptor binding in rats. *Epilepsy Research*, *23*(3), 225-233. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(95\)00103-4](https://doi.org/10.1016/0920-1211(95)00103-4)
- Rocha, L., Briones, M., Ackermann, R. F., Anton, B., Maidment, N. T., Evans, C. J., & Engel, J. (1996). Pentylentetrazol-induced kindling: early involvement of excitatory and inhibitory systems. *Epilepsy Research*, *26*(1), 105-113. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(96\)00046-0](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(96)00046-0)
- Romsicki, Y., & Sharom, F. J. (2001). Phospholipid flippase activity of the reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochemistry*, *40*(23), 6937-6947. <https://doi.org/10.1021/bi0024456>

- Rothman, D. L., Dienel, G. A., Behar, K. L., Hyder, F., DiNuzzo, M., Giove, F., & Mangia, S. (2022). Glucose sparing by glycogenolysis (GSG) determines the relationship between brain metabolism and neurotransmission. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 42(5), 844-860. <https://doi.org/10.1177/0271678X211064399>
- Rueger, M. A., Keuters, M. H., Walberer, M., Braun, R., Klein, R., Sparing, R., Fink, G. R., Graf, R., & Schroeter, M. (2012). Multi-session transcranial direct current stimulation (tDCS) Elicits inflammatory and regenerative processes in the rat brain. *PLoS ONE*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043776>
- Sabersky, A., Mackow, M., Krishnan, B., Nair, D., Alexopoulos, A., Bingaman, W., & Gonzalez-Martinez, J. (2018). Closed-Loop Responsive Stimulation for Epilepsy. En *Neuromodulation* (pp. 1023-1030). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805353-9.00084-x>
- Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., & Morimoto, S. (2018). Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. En *Journal of Natural Medicines* (Vol. 72, Número 1, pp. 32-42). Springer Tokyo. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1144-z>
- Santana-Gómez, C. E., Alcántara-González, D., Luna-Munguía, H., Bañuelos-Cabrera, I., Magdaleno-Madrigal, V. M., Fernández-Mas, R., Besio, W., & Rocha, L. (2015). Transcranial focal electrical stimulation reduces the convulsive expression and amino acid release in the hippocampus during pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Epilepsy & Behavior*, 49, 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.04.037>
- Santos-Valencia, F., Almazán-Alvarado, S., Rubio-Luviano, A., Valdés-Cruz, A., Magdaleno-Madrigal, V. M., & Martínez-Vargas, D. (2019). Temporally irregular electrical stimulation to the epileptogenic focus delays epileptogenesis in rats. *Brain Stimulation*, 12(6), 1429-1438. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2019.07.016>
- Sato, K., Morimoto, K., & Okamoto, M. (1988a). Anticonvulsant action of a non-competitive antagonist of NMDA receptors (MK-801) in the kindling model of epilepsy. *Brain Research*, 463(1), 12-20. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90521-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90521-5)
- Sato, K., Morimoto, K., & Okamoto, M. (1988b). Anticonvulsant action of a non-competitive antagonist of NMDA receptors (MK-801) in the kindling model of epilepsy. En *Brain Research* (Vol. 463).
- Sato, M., Racine, R. J., & McIntyre, D. C. (1990). Kindling: basic mechanisms and clinical validity. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 76(5), 459-472. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(90\)90099-6](https://doi.org/10.1016/0013-4694(90)90099-6)
- Saugstad, J. A. (2010). MicroRNAs as effectors of brain function with roles in ischemia and injury, neuroprotection, and neurodegeneration. En *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (Vol. 30, Número 9, pp. 1564-1576). <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.101>
- Schinkel, A. H., Smit, J. J. M., van Tellingen, O., Beijnen, J. H., Wagenaar, E., Van Deemter, L., Mol, C. A. A. M., van der Valk, M. A., Robanus-Maandag, E. C., te Riele, H. P. J., Berns, A. J. M., & Borst, P. (1994). Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, 77(4), 491-502. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90212-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90212-7)

- Schinkel, A. H., Wagenaar, E., Mol, C. A. A. M., & Van Deemter, L. (1996). P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *Journal of Clinical Investigation*, *97*(11), 2517-2524. <https://doi.org/10.1172/JCI118699>
- Schinkel, A. H., Wagenaar, E., Van Deemter, L., Mol, C. A. A. M., & Borst, P. (1995). Absence of the *mdr1a* P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *Journal of Clinical Investigation*, *96*(4), 1698-1705. <https://doi.org/10.1172/JCI118214>
- Schmeiser, B., Zentner, J., Prinz, M., Brandt, A., & Freiman, T. M. (2017). Extent of mossy fiber sprouting in patients with mesiotemporal lobe epilepsy correlates with neuronal cell loss and granule cell dispersion. *Epilepsy Research*, *129*, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2016.11.011>
- Seebacher, N. A., Richardson, D. R., & Jansson, P. J. (2015). Glucose modulation induces reactive oxygen species and increases P-glycoprotein-mediated multidrug resistance to chemotherapeutics. *British Journal of Pharmacology*, *172*(10), 2557-2572. <https://doi.org/10.1111/bph.13079>
- Seegers, U., Potschka, H., & Löscher, W. (2002a). Expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in brain capillary endothelial cells and brain parenchyma of amygdala-kindled rats. *Epilepsia*, *43*(7), 675-684. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2002.33101.x>
- Seegers, U., Potschka, H., & Löscher, W. (2002b). Transient increase of P-glycoprotein expression in endothelium and parenchyma of limbic brain regions in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, *51*(3), 257-268. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(02\)00156-0](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(02)00156-0)
- Siebner, H. R., Funke, K., Aberra, A. S., Antal, A., Bestmann, S., Chen, R., Classen, J., Davare, M., Di Lazzaro, V., Fox, P. T., Hallett, M., Karabanov, A. N., Kesselheim, J., Beck, M. M., Koch, G., Liebetanz, D., Meunier, S., Miniussi, C., Paulus, W., ... Ugawa, Y. (2022). Transcranial magnetic stimulation of the brain: What is stimulated? – A consensus and critical position paper. En *Clinical Neurophysiology* (Vol. 140, pp. 59-97). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2022.04.022>
- Silver, J. M., Shin, C., & McNamara, J. O. (1991). Antiepileptogenic effects of conventional anticonvulsants in the kindling model of epilepsy. *Annals of Neurology*, *29*(4), 356-363. <https://doi.org/10.1002/ana.410290404>
- Sisodiya, S. M., Lin, W. R., Harding, B. N., Squier, M. V., & Thom, M. (2002). Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain*, *125*(1), 22-31. <https://doi.org/10.1093/brain/awf002>
- Stables, J. P., Bertram, E., Dudek, F. E., Holmes, G., Mathern, G., Pitkänen, A., & White, H. S. (2003). Therapy Discovery for Pharmacoresistant Epilepsy and for Disease-modifying Therapeutics: Summary of the NIH/NINDS/AES Models II Workshop. *Epilepsia*, *44*(12), 1472-1478. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2003.32803.x>

- Stratton, S. C., Large, C. H., Cox, B., Davies, G., & Hagan, R. M. (2003). Effects of lamotrigine and levetiracetam on seizure development in a rat amygdala kindling model. *Epilepsy Research*, 53(1-2), 95-106. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(02\)00254-1](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(02)00254-1)
- Suzuki, H., Yoshida, T., Morisada, N., Uehara, T., Kosaki, K., Sato, K., Matsubara, K., Takano-Shimizu, T., & Takenouchi, T. (2019). De novo NSF mutations cause early infantile epileptic encephalopathy. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 6(11), 2334-2339. <https://doi.org/10.1002/acn3.50917>
- Swanson, R. A., & Choi, D. W. (1993). Glial Glycogen Stores Affect Neuronal Survival during Glucose Deprivation in vitro. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 13(1), 162-169. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1993.19>
- Tang, X., Chen, X., Li, X., Cheng, H., Gan, J., & Liu, Z. (2022). The TLR4 mediated inflammatory signal pathway might be involved in drug resistance in drug-resistant epileptic rats. *Journal of Neuroimmunology*, 365. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2021.577802>
- Tavakoli, H., & Heidarpanah, A. (2023). A Literature Review of the Efficacy of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation on Epilepsy. En *Iranian Journal of Child Neurology* (Vol. 17, Número 1, pp. 9-28). Iranian Child Neurology Society. <https://doi.org/10.22037/ijcn.v17i2.38752>
- Tishler, D. M., Weinberg, K. I., Hinton, D. R., Barbaro, N., Annett, G. M., & Raffel, C. (1995). MDR1 Gene Expression in Brain of Patients with Medically Intractable Epilepsy. *Epilepsia*, 36(1), 1-6. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1995.tb01657.x>
- Trommer, B. L., & Pasternak, J. F. (1990). NMDA receptor antagonists inhibit kindling epileptogenesis and seizure expression in developing rats. *Developmental Brain Research*, 53(2), 248-252. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(90\)90014-P](https://doi.org/10.1016/0165-3806(90)90014-P)
- Valdés-Cruz, A., Negrete-Díaz, J. V., Magdaleno-Madrigal, 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(8), 738-746. <https://doi.org/10.1002/syn.21563>
- Valdés-Cruz, A., Villasana-Salazar, B., Williams, B., Martínez-Vargas, D., Magdaleno-Madrigal, V. M., Almazán-Alvarado, S., & Besio, W. (2019). Transcranial focal electrical stimulation via concentric ring electrodes in freely moving cats: Antiepileptogenic and postictal effects. *Experimental Neurology*, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113012>
- Valverde, M. A., Díaz, M., Sepúlveda, F. V., Gill, D. R., Hyde, S. C., & Higgins, C. F. (1992). Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature*, 355(6363), 830-833. <https://doi.org/10.1038/355830a0>
- van Vliet, E. A., Zibell, G., Pekcec, A., Schlichtiger, J., Edelbroek, P. M., Holtman, L., Aronica, E., Gorter, J. A., & Potschka, H. (2010). COX-2 inhibition controls P-glycoprotein expression and promotes brain delivery of phenytoin in chronic epileptic rats. *Neuropharmacology*, 58(2), 404-412. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.09.012>
- Vanoye, C. G., Castro, A. F., Pourcher, T., Reuss, L., Altenberg, G. A., & Phosphorylation, G. A. (1999). *Phosphorylation of P-glycoprotein by PKA and PKC modulates swelling-activated Cl<sup>-</sup> currents.*

- Vega-García, A., Orozco-Suárez, S., Villa, A., Rocha, L., Feria-Romero, I., Alonso Vanegas, M. A., & Guevara-Guzmán, R. (2021). Cortical expression of IL1- $\beta$ , Bcl-2, Caspase-3 and 9, SEMA-3a, NT-3 and P-glycoprotein as biological markers of intrinsic severity in drug-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain Research*, 1758(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147303>
- Vezzani, A., & Granata, T. (2005). Brain inflammation in epilepsy: Experimental and clinical evidence. *Epilepsia*, 46(11), 1724-1743. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00298.x>
- Volk, H., Burkhardt, K., Potschka, H., Chen, J., Becker, A., & Löscher, W. (2004). Neuronal expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures. *Neuroscience*, 123(3), 751-759. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.10.012>
- Volk, H., Potschka, H., & Löscher, W. (2004). Increased expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in limbic brain regions after amygdala-kindled seizures in rats. *Epilepsy Research*, 58(1), 67-79. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2003.12.009>
- Volk, H., Potschka, H., & Löscher, W. (2005). Immunohistochemical localization of P-glycoprotein in rat brain and detection of its increased expression by seizures are sensitive to fixation and staining variables. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 53(4), 517-531. <https://doi.org/10.1369/jhc.4A6451.2005>
- Wadkins, R. M., & Roepe, P. D. (1997). Biophysical aspects of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *International Review of Cytology*, 171, 121-165. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62587-5](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62587-5)
- Wang, G., Xie, G., Han, L., Wang, D., Du, F., Kong, X., & Su, G. (2019). Involvement of hypoxia-inducible factor-1 alpha in the upregulation of P-glycoprotein in refractory epilepsy. *Neuroreport*, 30(17), 1191-1196. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001345>
- Wang, J., & Zhao, J. (2021). MicroRNA Dysregulation in Epilepsy: From Pathogenetic Involvement to Diagnostic Biomarker and Therapeutic Agent Development. En *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.650372>
- Wang, X., Huang, S., Jiang, Y., Liu, Y., Song, T., Li, D., & Yang, L. (2018). Reactive astrocytes increase the expression of P-gp and Mrp1 via TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B signaling. *Molecular Medicine Reports*, 17(1), 1198-1204. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7939>
- Wang, Y. L., Liang, S. F., Su, A. W. Y., & Shaw, F. Z. (2018). Spike densities of the amygdala and neocortex reflect progression of kindled motor seizures. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 56(1), 99-112. <https://doi.org/10.1007/s11517-017-1672-4>
- Wang, Y., Xu, Z., Cheng, H., Guo, Y., Xu, C., Wang, S., Zhang, J., Ding, M., & Chen, Z. (2014). Low-frequency stimulation inhibits epileptogenesis by modulating the early network of the limbic system as evaluated in amygdala kindling model. *Brain structure & function*, 219(5), 1685-1696. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0594-7>
- Watkins, P. A., Maviguel, D., Jia, Z., & Pevsner, J. (2007). Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome. *Journal of Lipid Research*, 48(12), 2736-2750. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700378-JLR200>

- Whiteheart, S. W., Rossnagel, K., Buhrow, S. A., Brunner, M., Jaenicke, R., & Rothman, J. E. (1994). N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein: a trimeric ATPase whose hydrolysis of ATP is required for membrane fusion. *Journal of Cell Biology*, 126(4), 945-954. <https://doi.org/10.1083/jcb.126.4.945>
- Wick, A., Wick, W., Hirrlinger, J., Gerhardt, E., Dringen, R., Dichgans, J., Weller, M., & B. Schulz, J. (2004). Chemotherapy-induced cell death in primary cerebellar granule neurons but not in astrocytes: in vitro paradigm of differential neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, 91(5), 1067-1074. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02774.x>
- World Health Organization. (2019). WHO | Epilepsy: a public health imperative. En *Who*. [https://www.who.int/mental\\_health/neurology/epilepsy/report\\_2019/en/](https://www.who.int/mental_health/neurology/epilepsy/report_2019/en/)
- Wu, D. C., Xu, Z. H., Wang, S., Fang, Q., Hu, D. Q., Li, Q., Sun, H. L., Zhang, S. H., & Chen, Z. (2008). Time-dependent effect of low-frequency stimulation on amygdaloid-kindling seizures in rats. *Neurobiology of Disease*, 31(1), 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.03.007>
- Xie, Y., Wang, M., Shao, Y., & Chen, Y. (2023). LncRNA H19 Regulates P-glycoprotein Expression Through the NF-κB Signaling Pathway in the Model of Status Epilepticus. *Neurochemical Research*, 48(3), 929-941. <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03803-w>
- Yang, D., Wang, Q., Xu, C., Fang, F., Fan, J., Li, L., Du, Q., Zhang, R., Wang, Y., Lin, Y., Huang, Z., Wang, H., Chen, C., Xu, Q., Wang, Y., Zhang, Y., Zhang, Z., Zhao, X., Zhao, X., ... Wang, Y. (2019). Transcranial direct current stimulation reduces seizure frequency in patients with refractory focal epilepsy: A randomized, double-blind, sham-controlled, and three-arm parallel multicenter study. *Brain Stimulation*. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2019.09.006>
- Zhang, H., Qu, Y., & Wang, A. (2018). Antagonist targeting microRNA-146a protects against lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats by nuclear factor-κB pathway. *Molecular Medicine Reports*, 17(4), 5356-5361. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8465>
- Zuo, C., Cao, H., Feng, F., Li, G., Huang, Y., Zhu, L., Gu, Z., Yang, Y., Chen, J., Jiang, Y., & Wang, F. (2022). Repetitive transcranial magnetic stimulation exerts anti-inflammatory effects via modulating glial activation in mice with chronic unpredictable mild stress-induced depression. *International Immunopharmacology*, 109. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108788>

Article

# Transcranial Focal Electric Stimulation Avoids P-Glycoprotein Over-Expression during Electrical Amygdala Kindling and Delays Epileptogenesis in Rats

Daniel Fonseca-Barriendos <sup>1</sup>, José Luis Castañeda-Cabral <sup>2</sup>, Frida Martínez-Cuevas <sup>1</sup>, Walter Besio <sup>3</sup>, Alejandro Valdés-Cruz <sup>4,\*</sup> and Luisa Rocha <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Ciudad de México C.P. 14330, Mexico; daniel.fonseca@cinvestav.mx (D.F.-B.); fridamartinezcuevas@cinvestav.mx (F.M.-C.)

<sup>2</sup> Departamento de Biología Celular y Molecular, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Zapopan C.P. 44600, Mexico; jose.castaneda@uag.mx

<sup>3</sup> Department of Electrical, Computer, and Biomedical Engineering, University of Rhode Island, Kingston, RI 02881, USA; besio@uri.edu

<sup>4</sup> Laboratorio de Neurofisiología del Control y la Regulación, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", Ciudad de México C.P. 14370, Mexico

\* Correspondence: alevalc@imp.edu.mx (A.V.-C.); lrocha@cinvestav.mx (L.R.)



**Citation:** Fonseca-Barriendos, D.; Castañeda-Cabral, J.L.; Martínez-Cuevas, F.; Besio, W.; Valdés-Cruz, A.; Rocha, L. Transcranial Focal Electric Stimulation Avoids P-Glycoprotein Over-Expression during Electrical Amygdala Kindling and Delays Epileptogenesis in Rats. *Life* 2023, 13, 1294. <https://doi.org/10.3390/life13061294>

**Academic Editors:** Andrés Molero-Chamizo and Guadalupe Nathaidy Rivera-Urbina

Received: 13 April 2023

Revised: 23 May 2023

Accepted: 24 May 2023

Published: 31 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Recent evidence suggests that P-glycoprotein (P-gp) overexpression mediates hyperexcitability and is associated with epileptogenesis. Transcranial focal electrical stimulation (TFS) delays epileptogenesis and inhibits P-gp overexpression after a generalized seizure. Here, first we measured P-gp expression during epileptogenesis and second, we assessed if TFS antiepileptogenic effect was related with P-gp overexpression avoidance. Male Wistar rats were implanted in right basolateral amygdala and stimulated daily for electrical amygdala kindling (EAK), P-gp expression was assessed during epileptogenesis in relevant brain areas. Stage I group showed 85% increase in P-gp in ipsilateral hippocampus ( $p < 0.001$ ). Stage III group presented 58% and 57% increase in P-gp in both hippocampi ( $p < 0.05$ ). Kindled group had 92% and 90% increase in P-gp in both hippocampi ( $p < 0.01$ ), and 93% and 143% increase in both neocortices ( $p < 0.01$ ). For the second experiment, TFS was administered daily after each EAK stimulation for 20 days and P-gp concentration was assessed. No changes were found in the TFS group ( $p > 0.05$ ). Kindled group showed 132% and 138% increase in P-gp in both hippocampi ( $p < 0.001$ ) and 51% and 92% increase in both cortices ( $p < 0.001$ ). Kindled + TFS group presented no changes ( $p > 0.05$ ). Our experiments revealed that progression of EAK is associated with increased P-gp expression. These changes are structure-specific and dependent on seizure severity. EAK-induced P-gp overexpression would be associated with neuronal hyperexcitability and thus, epileptogenesis. P-gp could be a novel therapeutic target to avoid epileptogenesis. In accordance with this, TFS inhibited P-gp overexpression and interfered with EAK. An important limitation of the present study is that P-gp neuronal expression was not evaluated under the different experimental conditions. Future studies should be carried out to determine P-gp neuronal overexpression in hyperexcitable networks during epileptogenesis. The TFS-induced lessening of P-gp overexpression could be a novel therapeutic strategy to avoid epileptogenesis in high-risk patients.

**Keywords:** P-glycoprotein; epileptogenesis; neuromodulation; hippocampus; neocortex; kindling; TFS

## 1. Introduction

P-glycoprotein (P-gp) is a 170 kDa transmembrane protein member of the ABC transporter family [1]. Under physiological conditions, P-gp is expressed in several organs such as the colon, kidneys, liver, among others [2,3]. In the central nervous system, P-gp is



expressed in the endothelial cells and astrocyte foot process of the blood brain barrier (BBB); and the choroid plexus [4–8]. P-gp expression in these cells has been related to protection of the brain parenchyma from cytotoxic damage [9,10]. However, P-gp overexpression in epilepsy has been associated with multidrug-resistant phenotype [11–15]. Aberrant expression of P-gp in neurons has been described in brain tissue resected from patients with drug-resistant epilepsy and an animal model of severe seizures [12,16–18]. P-gp overexpression may be induced by several mechanisms including hypoxia [19,20], neuroinflammation [21,22], and/or excessive glutamate release [22,23], all conditions associated with seizure activity [24–28].

On the other hand, transcranial focal electrical stimulation (TFS) via tripolar concentric ring electrodes (TCRE) is a novel noninvasive neuromodulation strategy. TFS focuses on the electrical stimulation, with a uniform current density, directly below the electrode generating electric fields in subcortical regions without adverse effects [29–33]. TFS reduce the convulsive activity induced by several drugs [34–38]. Santana-Gómez and colleagues found that TFS reduced the seizure activity and lessens the excessive glutamate release during pilocarpine-induced status epilepticus [39].

Meanwhile, Pérez-Pérez and colleagues found that TFS restitutes the anticonvulsive effects of phenytoin in an animal model of pharmacoresistant seizures with P-gp overexpression. In addition, these authors found that TFS applied before the induction of a single generalized seizure avoids P-gp overexpression in both hippocampi and cerebral cortices [38]. Concerning epileptogenesis, it was found that TFS applied immediately after each electrical amygdala kindling (EAK) stimulation avoids the evolution of this process in cats, and this effect lasted several weeks after TFS cessation [40].

For the present study, we suggest that the progressive augmentation of neuronal excitability during epileptogenesis correlates with gradual P-gp overexpression. This hypothesis is supported because P-gp expressed in neurons may alter the resting membrane potential as a consequence of changes in the volume-gated chloride channels, the cellular pH, and acting as a lipid flippase [41–45]. We also suggest that TFS avoids P-gp overexpression during epileptogenesis. Here, we aimed to assess P-gp expression through epileptogenesis induced by EAK in both hippocampi and frontal cortices, areas related to seizure propagation in the rat brain [46–49]. We also investigated if the antiepileptogenic effect of TFS avoids the EAK-induced P-gp overexpression.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

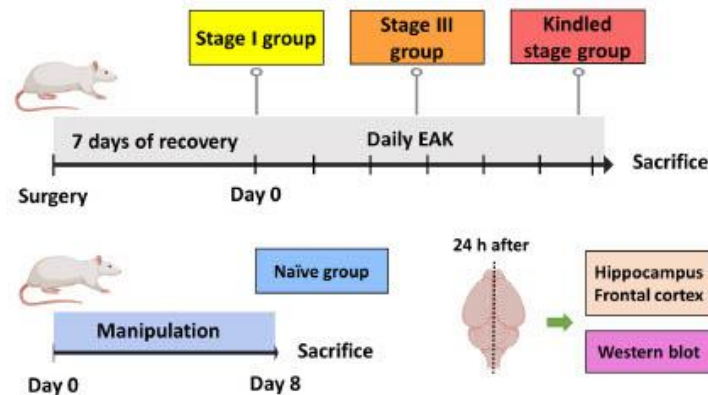
Male Wistar rats (300–350 g body weight), individually housed and maintained under environmentally controlled conditions (12 h light/dark cycles, 22 °C) with food and water ad libitum were used in the present study. All experiments were approved by the ethics committee of the National Institute of Psychiatry Ramon de la Fuente Muñiz (project NC123240.1) and performed according to the Mexican law for the care and use of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999).

### 2.2. Experiment 1: Evaluation of P-gp Expression during EAK-Induced Epileptogenesis

Surgery was performed with a mixture of Zoletil 50 (50 mg/kg IM) and xylazine hydrochloride (12 mg/kg IM). Stainless steel tripolar electrodes, insulated except at the tip, were stereotaxically implanted in the right basolateral amygdala (AP-2.8, L + 4.8, V-8.5) [50]. Two tips of the tripolar electrodes were used for electrical stimulation and the third tip was used for signal recording. Two epidural electrodes were also placed in both prefrontal cortices for electrographic recording. Additionally, three ground screws were implanted. All electrodes and ground screws were soldered into one header and the entire preparation was fixed to the skull with dental acrylic. Rats were allowed to recover for 7–10 days before any manipulation and were treated with oral antibiotics (enrofloxacin 12 mg/kg).

### 2.2.1. Experimental Groups

Kindled group ( $n = 5$ ). After recovery, after-discharge threshold (ADT) was estimated. Then, daily EAK stimulation was applied until three consecutive stage V seizures were elicited. Animals were decapitated 24 h after the last stage V seizure and resection of the ipsi- and contralateral hippocampi and neocortices was performed. All tissue was stored at  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  until used to assess P-gp expression by Western blot (Figure 1).



**Figure 1.** Experimental protocol designed to evaluate P-gp expression during EAK-induced epileptogenesis. The kindled group was stimulated daily until three consecutive stage V seizures were evoked. The stage III group was stimulated daily until the first stage III seizure was evoked. The stage I group only received the ADT determination. The naïve group was manipulated as the previous group, but no surgery nor electrical stimulation were performed. All animals were sacrificed 24 h after the last manipulation. The ipsi- and contralateral hippocampi and frontal cortices were obtained for subsequent estimation of protein expression by Western blot.  $n = 5$  per group.

Stage III group ( $n = 5$ ). The experimental manipulation was as described above, except that animals were decapitated 24 h after the first stage III seizure.

Stage I group ( $n = 5$ ). Animals were manipulated as described above, except that they were decapitated 24 h after the ADT estimation.

Naïve group ( $n = 5$ ). Rats were handled as the stage I group. However, no surgery or electrical stimulation were performed. Results obtained from this group were considered as control condition.

### 2.2.2. ADT, EAK, and EEG

Two tips of the tripolar electrode implanted in the right basolateral amygdala were used for ADT determination. The electrical stimulation (1 ms monophasic square pulses at 60 Hz for 1 s) started at  $100\text{ }\mu\text{A}$  through a S11 stimulator (Grass, MA, USA). The current intensity was increased by 20% every 3 min until the animals presented ipsilateral eye blink accompanied by a brief afterdischarge (3–4 s) [51]. Daily EAK started the following day using the ADT parameters previously determined and behavioral assessment was performed according to the Racine's scale [52]. Electrographic activity from the epidural and amygdala electrodes was recorded using a 78 E polygraphic equipment (Grass, MA, USA), preamplified and band-pass filtered between 3 and 300 Hz, and acquired on-line (500 Hz sampling frequency) using an analog to digital conversion system (ADQ8CH). Signal analysis was conducted off-line using a computational program (ADQ8CH, Mexico City, Mexico). Both the analog to digital conversion system and the software were custom made [40,53]. All signal analysis was performed offline.



### 2.2.3. Western Blotting

Western blot is a sensitive semi quantitative technique that allows us to identify changes in protein expression even if they are expressed in picograms. With proper antibodies, this technique is highly sensitive and specific and thus, was chosen to assess P-gp expression during EAK-induced epileptogenesis [54].

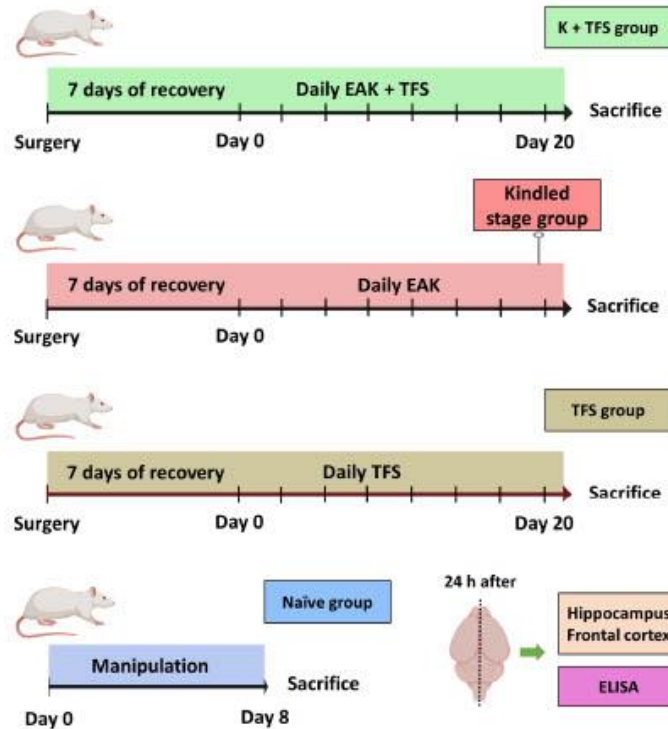
Brain samples were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.1% Triton X-100) with a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Germany) in a cold bath at 4 °C. Then, homogenates were centrifuged at  $14,000 \times g$  for 10 min at 4 °C and the supernatant (total protein extract) was immediately collected, aliquoted, and frozen at 70 °C until use. Protein concentration was assessed in the extracts according to the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) using bovine serum albumin (BSA) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) as standard. Samples (50 µg) of total protein extract were boiled for 5 min at 95 °C in Laemmli buffer (500 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 10% β-mercaptoethanol, and 0.1% bromophenol blue). Electrophoresis was carried out in running buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, and 0.1% SDS, pH 8.3; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) at 85 V for 30 min and 100 V for 2 h SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5%). The electrotransference was done on a polyvinylidene difluoride membrane (Immun-Blot, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) at 110 V for 30 min using transfer buffer (25 mM Trizma base, 250 mM glycine, and 20% methanol, pH 8.3). Unspecific binding was blocked for 1 h at 4 °C with a 5% blocking solution (Blot-QuickBlocker, EMD Millipore, Oakville, Ontario, CA, USA) in TBS-T buffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5). The membranes were incubated overnight with the primary antibodies at 4 °C with gentle shaking, used as follows: rabbit monoclonal anti-P-gp (1:1000; Cat. ab170904; Abcam, Waltham, MA, USA) and rabbit monoclonal anti-actin (1:1000; Cat. ab179467; Abcam, Waltham, MA, USA). All primary antibodies were diluted in TBS buffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5). Membranes were washed 3× with TBS-T buffer at 4 °C for 5 min each and followed by incubation with the corresponding secondary antibody HRP-goat anti-rabbit IgG (1:5000 and 1:10,000 for P-gp and actin, respectively) for 2 h at 4 °C diluted in TBS. Finally, the membranes were incubated in peroxide/luminol solution (Clarity Western ECL substrate, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) at room temperature for 5 min. The chemiluminescent data were normalized using actin as constitutive protein, resulting in an expression ratio relative, with determinations by duplicate.

### 2.3. Experiment 2: Evaluation of TFS on the EAK-Induced P-gp Overexpression

This experiment was designed to assess if the antiepileptogenic effect of TFS avoids the EAK-induced P-gp overexpression.

#### Experimental Groups

Kindled + TFS (K + TFS) ( $n = 5$ ). Surgery was performed as described previously (Section 2.2) except that a TCRE (6 mm diameter) was placed over the sagittal suture, between bregma and lambda. Electrodes were soldered into two headers: one for TFS and the rest for EAK, including grounds. ADT was estimated as described in Section 2.2.2. Thereafter, rats received EAK and immediately after, TFS was applied for 2 min (300 Hz, 200 µs biphasic square pulses at 1.5 mA) through the outer ring and the central disc (with the middle ring floating) of the TCRE using a S88 stimulator (Grass, MA, USA). This procedure was repeated daily for 20 days. Behavioral and EEG signals were recorded during EAK and TFS and were analyzed as described in Section 2.2.2. Rats were decapitated 24 h after the last electrical stimulation and resection of hippocampi and neocortices (ipsi- and contralateral) was performed (Figure 2). P-gp protein concentration was evaluated by Elisa assay following the manufacturer's instructions (US Biological Life Sciences Cat. 353596). An Elisa assay was chosen for this experiment as this quantitative technique has high sensitivity and yields high throughput results [55].



**Figure 2.** Experimental protocol designed to evaluate the effect of TFS on the EAK-induced P-gp overexpression. The kindled + TFS group (K + TFS) received daily kindling stimulation immediately followed by TFS for 20 days. The kindled group was stimulated daily until three consecutive stage V seizures were evoked. The TFS group received daily TFS for 20 days. The naive group was manipulated as the previous groups, but no surgery nor electrical stimulation were performed. Animals were sacrificed 24 h after the last manipulation. The ipsi- and contralateral hippocampi and frontal cortices were obtained for subsequent estimation of protein expression by Elisa assay.  $n = 5$  per group.

**Kindled ( $n = 5$ ).** Animals were handled as described for the K + TFS group, except that TFS was not applied. Stimulation was stopped when rats presented three consecutive stage V seizures and tissue collection was performed as described above.

**TFS ( $n = 5$ ).** Animals were handled as described for the K + TFS group, except that only TFS was applied daily for 20 days.

**Naive ( $n = 5$ ).** Rats were handled as the TFS group. However, no surgery or electrical stimulation were performed. Results of this group were considered as control condition.

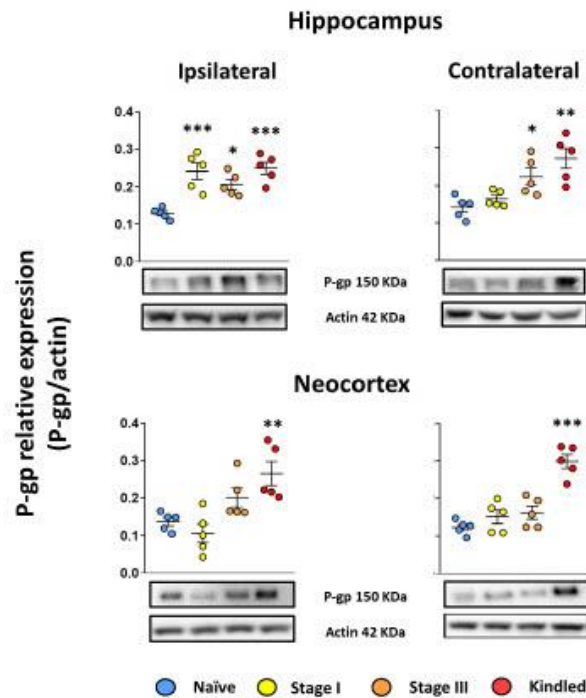
#### 2.4. Statistical Analysis

EAK progression, Western blot and Elisa assay data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Normality was assessed by Shapiro-Wilk test. Statistical analysis of group differences was performed by one way analysis of variance (ANOVA), two-way ANOVA for repeated measures followed by Tukey post hoc test and unpaired T test. Spearman's correlation analysis was performed between EAK data and Western blot/Elisa results. Significance level was set to  $p < 0.05$ . All statistical analysis and graph construction were performed using GraphPad Prism Software v.8.01 (GraphPad Software Inc., Boston, MA, USA).

### 3. Results

#### 3.1. EAK-Induced Epileptogenesis Is Associated with P-gp Overexpression

The naïve group did not present any behavioral modification during handling. Western blot results showed that the hippocampal P-gp relative expression (P-gp/actin) was  $0.12 \pm 0.014$  and  $0.14 \pm 0.03$  right and left, respectively. As for the neocortex, the P-gp relative expression index was  $0.13 \pm 0.023$  and  $0.12 \pm 0.018$  right and left, respectively (Figure 3).



**Figure 3.** EAK-induced epileptogenesis is associated with P-gp overexpression. Graph represents the expression ratio of P-gp relative to actin in the hippocampus (upper panels) and neocortex (lower panels) ipsi- (left panels) and contralateral (right panels) to the amygdala stimulated of stage I, stage III, and Kindled groups. Naïve data represent right and left structures as no surgery was performed. Representative images of P-gp detection and its respective loading control protein actin are included. Data show the mean  $\pm$  SEM. Each sample was assessed by duplicate. Statistical significance between groups is represented by \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ . ANOVA test with Tukey's multiple comparisons test.

Concerning the stage I group, the ADT was  $284 \pm 92 \mu\text{A}$ . During the ADT estimation, the amygdala EEG recordings revealed an afterdischarge of  $3.11 \pm 1.7 \text{ s}$  duration with a spike frequency of  $1.3 \pm 0.15$  spikes per second. No epileptiform activity was recorded in the epidural electrodes. Western blot analysis revealed an 85% increased relative expression of P-gp in hippocampus ipsilateral to the amygdala stimulated ( $0.24 \pm 0.048$ ,  $p < 0.001$  vs. naïve group). No changes were found in the contralateral hippocampus ( $0.16 \pm 0.02$ ,  $p > 0.05$  vs. naïve group) nor the neocortices ( $0.10 \pm 0.054$  and  $0.15 \pm 0.04$  ipsi- and contralateral, respectively, both  $p > 0.05$  vs. naïve) (Figure 3). Correlation analysis was performed with the EEG data (afterdischarge duration and spike frequency), ADT and P-gp relative expression; however, no significant correlations were found.



The ADT for the stage III group was  $341 \pm 132 \mu\text{A}$  ( $p > 0.05$  vs. stage I group) and  $4 \pm 1$  kindling trials were necessary to achieve the first stage III seizure. The first stage III seizure was associated with an afterdischarge in the amygdala stimulated lasting for  $13.31 \pm 7.14$  s ( $p > 0.05$  vs. stage I group) and with a spike frequency of  $2.13 \pm 0.25$  ( $p < 0.001$  vs. stage I group). Electrographic recording revealed an afterdischarge propagation to the cortex ( $13.1 \pm 6.68$  s of duration with a spike frequency of  $1.67 \pm 0.76$ ). Western blot analysis revealed a 58.9% and 57.14% increase in P-gp expression in both hippocampi ( $0.20 \pm 0.03$  and  $0.22 \pm 0.049$  ipsi- and contralateral to the amygdala stimulated, respectively, both  $p < 0.05$  vs. naïve group;  $p > 0.05$  vs. stage I group ipsilateral hippocampus). No changes were found in the neocortices ( $0.2 \pm 0.057$  and  $0.16 \pm 0.039$ , ipsi- and contralateral respectively,  $p > 0.05$  vs. naïve group) (Figure 3). Correlation analysis was performed with the EEG data (afterdischarge duration and spike frequency), ADT, number of kindling trials, and p-gp relative expression; however, no significant correlations were found.

The ADT for the Kindled group was  $446 \pm 125 \mu\text{A}$  ( $p > 0.05$  vs. stage I and stage III groups). A total of  $15 \pm 1$  kindling trials were applied to achieve the kindled stage. During the last stage V seizure, the EEG recording revealed an afterdischarge of  $75.29 \pm 44.63$  s of duration ( $p < 0.01$  vs. stage III group and  $p < 0.001$  vs. stage I group) with a spike frequency of  $2.26 \pm 0.07$  ( $p < 0.001$  vs. stage I group and  $p > 0.05$  vs. stage III group). The afterdischarge propagated to the cortex and lasted  $74 \pm 42.43$  s ( $p < 0.05$  vs. stage III group) with a frequency of  $2.2 \pm 0.11$  ( $p > 0.05$  vs. stage III group). Western blot analysis revealed a 92% and 90% increase in p-gp expression in both hippocampi ( $0.249 \pm 0.035$  and  $0.271 \pm 0.06$ ,  $p < 0.001$  and  $p < 0.01$  vs. naïve group, ipsi- and contralateral to the stimulated amygdala, respectively). As for the neocortices, a 93% and 143% increase in P-gp relative expression was found ( $0.26 \pm 0.07$  and  $0.299 \pm 0.04$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  vs. naïve group, ipsi- and contralateral, respectively) (Figure 3). Correlation analysis revealed that higher spike frequency during stage V seizures correlated with higher P-gp protein expression in the contralateral hippocampus (Table 1).

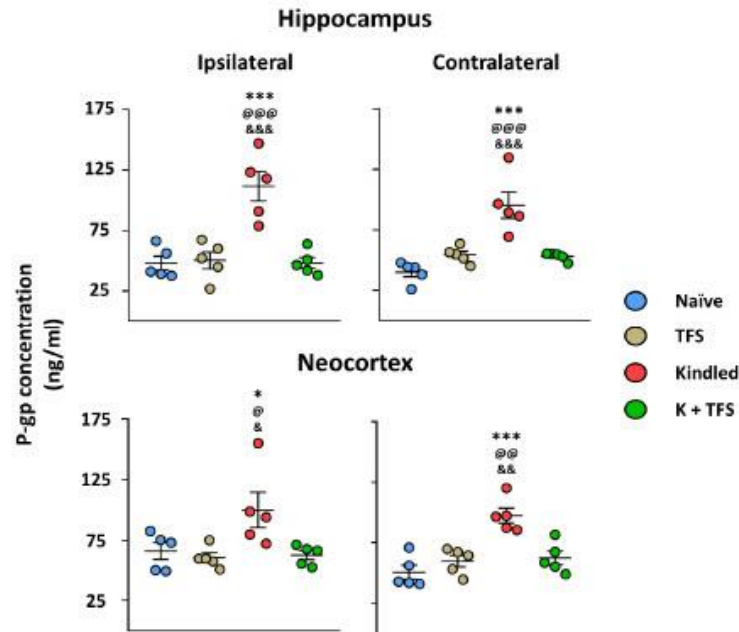
**Table 1.** Results of the correlation analysis between data obtained during EAK and the P-gp relative expression to actin in ipsi- and contralateral structures of the kindled group. Freq: frequency (spikes per second), Dur: duration of the afterdischarge (seconds). Values represent the Spearman R. Bold number indicates  $p < 0.05$ .

Site	P-gp Expression	Kindling Trials	Stage I		Stage II		Stage III		Stage IV		Stage V	
			Freq	Dur	Freq	Dur	Freq	Dur	Freq	Dur	Freq	Dur
Ipsilateral	Hippocampus	-0.791	-0.1	0.8	-0.4	0.6	0.3	-0.3	-0.5	-0.8	-0.4	-0.5
	Cortex	-0.316	-0.7	0.1	-0.4	0.6	-0.6	-0.4	-0.6	-0.6	0.5	-0.1
Contralateral	Hippocampus	0.316	-0.8	-0.6	-0.8	-0.2	-0.9	-0.1	0.1	0.1	<b>0.96</b>	0.6
	Cortex	0	-0.6	-0.2	-0.4	0.6	-0.7	-0.3	-0.5	-0.3	0.6	0

### 3.2. TFS Avoids P-gp Overexpression during the EAK-Induced Epileptogenesis

The naïve group did not present any behavioral alterations. Elisa assay revealed a P-gp protein concentration of  $48.05 \pm 12.61$  ng/mL in the right hippocampus,  $39.99 \pm 8.63$  ng/mL in the left hippocampus,  $66.03 \pm 15.27$  ng/mL in the right neocortex, and  $50.47 \pm 13.03$  ng/mL in the left neocortex (Figure 2).

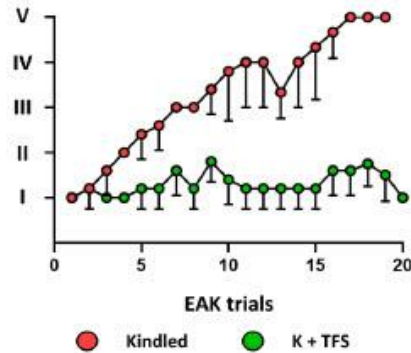
Animals of the TFS group did not present any behavioral or EEG alterations during the daily TFS. Elisa assay revealed that this group presented similar P-gp protein concentration in all structures analyzed ( $50.31 \pm 15.5$  and  $54.22 \pm 6.78$  ng/mL, right and left hippocampi,  $60.55 \pm 8.88$  and  $59.75 \pm 10.69$  ng/mL, right and left neocortex, respectively) compared to the naïve group ( $p > 0.05$ ) (Figure 4).



**Figure 4.** TFS avoids P-gp overexpression during the EAK-induced epileptogenesis. Graph represents the P-gp protein concentration in the hippocampus (upper panels) and neocortex (lower panels) ipsi- (left panels) and contralateral (right panels) to the amygdala stimulated of Kindled and K + TFS groups. Naïve data represent right and left structures as no surgery was performed. TFS data represent ipsi- and contralateral of the amygdala implanted. Data show the mean  $\pm$  SEM. Each sample was assessed by duplicate. Statistical significance between groups is represented by \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.001$  vs. naïve group; @  $p < 0.05$ , @@@  $p < 0.001$  vs. TFS group; &  $p < 0.05$ , &&&  $p < 0.001$  vs. K + TFS group. ANOVA test with Tukey's multiple comparisons test.

The ADT for the Kindled group was  $356 \pm 73 \mu\text{A}$  and  $15 \pm 3.1$  kindling trials were necessary to achieve the kindled stage (Figure 3). During the last stage V seizure, the amygdala afterdischarge lasted  $88.27 \pm 18.16$  s and its frequency was  $3.04 \pm 0.26$  spikes per second. The afterdischarge propagated to the cortex and lasted  $70.11 \pm 34.1$  with a frequency of  $2.2 \pm 0.26$ . Elisa assay revealed a 132% increase in the hippocampus ipsilateral to the amygdala stimulated ( $111.6 \pm 27.1$ ,  $p < 0.001$  vs. naïve and TFS groups), 138% increase in the contralateral hippocampus ( $95.31 \pm 24.17$ ,  $p < 0.001$  vs. naïve and TFS groups), 51% in the ipsilateral neocortex ( $99.92 \pm 32.63$ ,  $p > 0.05$  vs. naïve group and  $p < 0.05$  vs. TFS group), and 92% in the contralateral neocortex ( $97.3 \pm 13.76$ ,  $p < 0.001$  vs. naïve group and  $p < 0.01$  vs. TFS group) (Figure 4).

The ADT for the K + TFS group was  $284 \pm 71 \mu\text{A}$  ( $p > 0.05$  vs. kindled). During the experimental procedure, K + TFS trials only evoked stage I and stage II seizures (Figure 5). During the last stimulation, the amygdala afterdischarge lasted  $6.14 \pm 4.6$  s ( $p < 0.001$  vs. kindled group last seizure) and its frequency was  $1.6 \pm 0.46$  spikes per second ( $p < 0.001$  vs. kindled group last seizure). Cortical propagation of the afterdischarge was absent in this group. Elisa assay revealed P-gp protein concentration remained like those obtained for the naïve group in both hippocampi (0.39% and 6%,  $48.24 \pm 9.97$  and  $52.94 \pm 3.32$ , ipsi- and contralateral to the amygdala stimulated respectively,  $p > 0.05$  vs. naïve and  $p < 0.001$  vs. kindled group) and both neocortices ( $-0.7\%$  and  $3\%$ ,  $62.73 \pm 8.17$  and  $62.29 \pm 12.7$ , ipsi- and contralateral respectively,  $p > 0.05$  vs. naïve and  $p < 0.05$  vs. kindled group) (Figure 4).

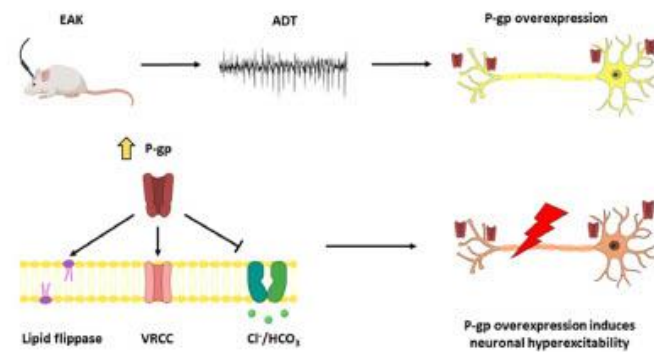


**Figure 5.** TFS applied immediately after each EAK trial interfered with kindling progression. Graph represents the mean—standard deviation of the behavioral seizure evoked by each daily kindling trial in the kindled and K + TFS groups.

**4. Discussion**

Our experiments revealed that EAK-induced epileptogenesis is associated with progressive increase in P-gp expression. These changes are structure-specific and dependent on seizure severity. On the other hand, the antiepileptogenic effect induced by TFS during the EAK is associated with inhibition of P-gp overexpression.

P-gp overexpression has been found in brain tissue resected from patients with pharmacoresistant epilepsy [12,15,16,18]. In these patients, P-gp overexpressed at the BBB would limit the penetration of antiseizure medications to the brain parenchyma, reducing their therapeutic efficacy and thus, facilitating the pharmacoresistant phenotype [56–58]. Evidence suggests that a single convulsive seizure may induce P-gp overexpression in the hippocampus and neocortex of the rat [38]. The results of the present study indicate for the first time that P-gp is overexpressed during EAK progression. This alteration is present since the first afterdischarge and depends on the brain area involved in the process and the rate of epileptogenesis. This data reveal that first, P-gp overexpression is not a phenomenon restricted to pharmacoresistant epilepsy and second, P-gp overexpression found after a seizure activity may be associated to local changes in network susceptibility (Figure 6).



**Figure 6.** ADT determination induces P-gp overexpression and is associated with epileptogenesis. ADT determination induces P-gp overexpression in the ipsilateral hippocampus. P-gp overexpression induces neuronal hyperexcitability through diverse mechanisms and facilitates epileptogenesis. ADT: afterdischarge threshold. EAK: electrical amygdala kindling. P-gp: P-glycoprotein. VRCC: volume regulated chloride channels.



P-gp overexpression may be induced by several mechanisms including hypoxia [19,20], neuroinflammation [21,22], and/or excessive glutamate release [22,23], all conditions associated with seizure activity [24–28].

An interesting finding from the present study was that the ADT estimation in naïve animals resulted in P-gp overexpression in the hippocampus ipsilateral to the stimulation. Previous data showed that EAK stages 0–I seizures propagated to the ipsilateral hippocampus even in a previously healthy network [48,59]. In addition, ipsilateral structures of the limbic system showed hypometabolism during EAK stages 0–I [59]. Glucose hypometabolism is recently considered a biomarker of increased glycogen consumption, high metabolic demand, and neuronal activity [60–62]. This group of evidence suggests that P-gp overexpression at EAK stages 0–I is the consequence of an environment favoring hyperexcitability characterized by increased extracellular glutamate, K<sup>+</sup>, and oxygen reactive species [63–65]. Supporting this notion, it is known that the systemic administration of a single subconvulsant dose of pentylenetetrazol results in increased glutamate release in the amygdala [66]. However, further studies are necessary to support this hypothesis and the participation of hypoxia or neuroinflammation in the P-gp overexpression at early kindling stages.

In the present study, the expression of the first stage III seizure was associated with P-gp overexpression in both hippocampi. Previous experiments showed that EAK stage III seizures appeared when the afterdischarge propagated to the contralateral hippocampus [48], an effect associated with an increased glutamate release in the ipsilateral hippocampus [67]. Interestingly, hypometabolism was present 24 h after the first stage III seizures in the contralateral hippocampus [59], suggesting an increased neuronal activity, decreased glucose metabolism, and a shift toward glycogen consumption in response to its recruitment. Concerning fully kindled rats, P-gp was overexpressed in hippocampus and neocortex, ipsi- and contralateral to the stimulation. P-gp overexpression in neocortex of fully kindled animals could be explained as a consequence of its recruitment during stage V seizures [46,68]. Indeed, stage V seizures are associated with increased glutamate release in the amygdala and hippocampus during interictal and ictal periods [67,69–71] and increased connectivity between the amygdala and cortices [46,68].

P-gp overexpression in neurons has been associated with hyperexcitability and thus, facilitates epileptogenesis [72]. This hypothesis originates from the findings that P-gp can alter the resting membrane potential of neurons as a consequence of changes in the volume-gated chloride channels, the cellular pH, and acting as a lipid flippase [41–45]. Our data show for the first time that P-gp is overexpressed during the EAK in brain areas related to seizure propagation, which may be facilitating hyperexcitability and epileptogenesis. An important limitation of the present study is that we did not assess P-gp expression in cellular types. Other authors did not find P-gp expression in brain parenchymal cells of kindled rats [73,74]. This situation can be explained as the consequence of different times of evaluation, antibodies specificity, and the protocol variables [75]. Future studies are necessary to assess if EAK induces neuronal P-gp expression.

On the other hand, our experiments support previous studies indicating that TFS applied immediately after each EAK trial interfered with kindling progression, delaying epileptogenesis [40]. In the present study, TFS current intensity was estimated using the electric field that induced the antiepileptogenic effect in cats [40] and translated to the rat brain limbic regions [29] without inducing tissue damage [30,32]. With this assessment, we expected that TFS applied over the skull of the rat generates an electric field that reaches subcortical regions involved in seizure propagation. As such, the antiepileptogenic effect we found in the rat was like that obtained by Valdés-Cruz and colleagues [40] who reported that TFS applied immediately after each EAK trial interfered with kindling progression in the cat.

The mechanisms of the antiepileptogenic effect of TFS are unknown. However, kindling progression is associated with increased glutamate release and activation of NMDA receptors [66,67,76,77]. Interestingly, there is evidence showing that TFS applied during pilocarpine-induced status epilepticus reversed the increased glutamate release in the

hippocampus [39]. Another mechanism that may be involved in TFS antiepileptogenic effect is the conduction block effect. This effect, induced during high frequency stimulation (>50 Hz), results in desynchronization of action potentials, increase in the axonal refractory period and potassium overload [78,79]. Lastly, preliminary results show that TFS increased the expression of NSF and decreased the expression of Sema3b in the cerebral cortex and increased *Acsn5* and *Cml3* in the hippocampus of naïve rats [80]. Future studies are needed to assess if the antiepileptogenic effect is associated with increased modulation of signaling cascades of neuroplasticity or decreased modulation of neuroinflammation and/or glutamatergic transmission.

As for other types of neuromodulations, low frequency stimulation (LFS) applied immediately after each kindling trial interfered with kindling progression [81,82]. Interestingly, delaying LFS did not present the antiepileptogenic effect [82]. Lastly, Wang and colleagues found that LFS delivered after the rat achieved stages II or III seizures did not modify the kindling progression and even worsened the seizure expression. Paired with the results of multielectrode arrays and microPET (micro positron emission tomography), the authors conclude that the limbic system formed an early focal network of afterdischarge propagation during the early stages of EAK [59]. Similarly, Valdés-Cruz and colleagues described that TFS applied before each kindling trial did not modify the kindling evolution in cats [40]. Our results support that TFS-induced antiepileptogenic effects rely on its application during the afterdischarge or epileptiform activity. We suggest that TFS antiepileptogenic effect could be associated with modulation of neuronal activity in the early focal network, avoiding P-gp overexpression and abolishing the recruitment of extra-limbic structures.

Studies evaluating human brain tissue support that higher P-gp activity is associated with neuronal hyperexcitability [83]. A recent publication from our group described that patients with posttraumatic epilepsy of long duration and poor surgical outcome had increased P-gp neuronal expression. Similarly, patients with frontal lobe epilepsy as consequence of tumors with shorter duration presented neuronal P-gp overexpression [16]. This study suggests that neuronal P-gp overexpression is present since the early stages of the disease and could be favoring epileptogenesis. Further studies using PET imaging are essential to determine the impact of P-gp overexpression in subjects with high risk of developing epilepsy. It is important to notice that P-gp overexpression in the brain has been considered as a therapeutic target to control drug-resistant epilepsy in humans. In this regard, Elkhayat and colleagues did not find changes in the seizure frequency of patients with drug-resistant epilepsy administered with verapamil (1.5 mg/kg/d), a P-gp inhibitor. The lack of efficacy inhibiting P-gp was explained by the long course of intractability and the persistent severe seizures [84]. Interestingly, Asadi-Pooya and colleagues found that adding higher doses of verapamil (120 mg/kg and 240 mg/kg) to the antiseizure medication resulted in an increased seizure control in a dose-dependent manner in patients with drug-resistant epilepsy [85]. Despite these positive results, verapamil induces adverse cardiovascular effects that limit its use as adjuvant treatment in the control of drug-resistant epilepsy. In this regard, TFS represents a non-invasive therapeutic approach to avoid epileptogenesis. Future studies should be designed to assess the optimal parameters of TFS necessary to suppress P-gp overexpression in human brain areas involved in seizure propagation.

## 5. Conclusions

Our experiments revealed that: (1) EAK-induced epileptogenesis is associated with progressive increase of P-gp expression. These changes are structure-specific and dependent on seizure severity. (2) inhibition of P-gp overexpression during epileptogenesis was associated with the antiepileptogenic effect of TFS. These findings are promising as TFS represents a novel therapeutic alternative of non-invasive neuromodulation in patients with high risk of epileptogenesis. Future studies should be performed in sight of clinical application.



**Author Contributions:** Conceptualization, A.V.-C. and L.R.; data curation, J.L.C.-C.; formal analysis, J.L.C.-C., F.M.-C. and L.R.; investigation, D.F.-B., W.B. and A.V.-C.; methodology, D.F.-B., J.L.C.-C., F.M.-C. and W.B.; writing—original draft, D.F.-B., W.B. and L.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The National Institute of Psychiatry “Ramon de la Fuente Muñiz” for its support through the project NC123240.1 and the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT) for its support through the scholarships no. 489736 and no. 753297 to D.F.-B. and F.M.-C., respectively.

**Institutional Review Board Statement:** All experiments were approved by the ethics committee of the National Institute of Psychiatry Ramon de la Fuente Muñiz (project NC123240.1) and performed according to the Mexican law for the care and use of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data is available upon request.

**Acknowledgments:** The authors express their gratitude to Francia Carmona Cruz, Stephanie Simón and Larissa Castillo Villegas for their technical support.

**Conflicts of Interest:** Besio is the CEO of CREmedical Corporation which develops concentric ring technologies. The remaining authors declare no conflict of interest.

## References

- Qosa, H.; Miller, D.S.; Pasinelli, P.; Trotti, D. Regulation of ABC Efflux Transporters at Blood-Brain Barrier in Health and Neurological Disorders. *Brain Res.* **2015**, *1628*, 298–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fardel, O.; Lecutteur, V.; Guillouzo, A. The P-Glycoprotein Multidrug Transporter. *Gen. Pharmac.* **1996**, *27*, 1283–1291. [[CrossRef](#)]
- Lazarowski, A.; Czornyj, L.; Lubienieki, F.; Girardi, E.; Vazquez, S.; D’Giano, C. ABC Transporters during Epilepsy and Mechanisms Underlying Multidrug Resistance in Refractory Epilepsy. *Epilepsia* **2007**, *48*, 140–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Beaulieu, É.; Demeule, M.; Ghitescu, L.; Béliveau, R. P-Glycoprotein Is Strongly Expressed in the Luminal Membranes of the Endothelium of Blood Vessels in the Brain. *Biochem. J.* **1997**, *326*, 539–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cordon-Cardo, C.; O’Brien, J.P.; Casals, D.; Rittman-Grauer, L.; Biedler, J.L.; Melamed, M.R.; Bertino, J.R. Multidrug-Resistance Gene (P-Glycoprotein) Is Expressed by Endothelial Cells at Blood-Brain Barrier Sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 695–698. [[CrossRef](#)]
- Golden, P.L.; Pardridge, W.M. P-Glycoprotein on Astrocyte Foot Processes of Unfixed Isolated Human Brain Capillaries. *Brain Res.* **1999**, *819*, 143–146. [[CrossRef](#)]
- Rao, V.V.; Dahlheimer, J.L.; Bardgett, M.E.; Snyder, A.Z.; Finch, R.A.; Sartorelli, A.C.; Piwnica-Worms, D. Choroid Plexus Epithelial Expression of MDR1 P Glycoprotein and Multidrug Resistance-Associated Protein Contribute to the Blood-Cerebrospinal-Fluid Drug-Permeability Barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3900–3905. [[CrossRef](#)]
- Schlachetzki, F.; Pardridge, W.M. P-Glycoprotein and Caveolin-1 $\alpha$  in Endothelium and Astrocytes of Primate Brain. *Neuroreport* **2003**, *14*, 695–698. [[CrossRef](#)]
- Schinkel, A.H.; Wagenaar, E.; Mol, C.A.A.M.; Van Deemter, L. P-Glycoprotein in the Blood-Brain Barrier of Mice Influences the Brain Penetration and Pharmacological Activity of Many Drugs. *J. Clin. Investig.* **1996**, *97*, 2517–2524. [[CrossRef](#)]
- Schinkel, A.H.; Wagenaar, E.; Van Deemter, L.; Mol, C.A.A.M.; Borst, P. Absence of the Mdr1a P-Glycoprotein in Mice Affects Tissue Distribution and Pharmacokinetics of Dexamethasone, Digoxin, and Cyclosporin A. *J. Clin. Investig.* **1995**, *96*, 1698–1705. [[CrossRef](#)]
- Aronica, E.; Sisodiya, S.M.; Gorter, J.A. Cerebral Expression of Drug Transporters in Epilepsy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 919–929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lazarowski, A.; Seveler, G.; Taratuto, A.; Massaro, M.; Rabinowicz, A. Tuberos Sclerosis Associated with MDR1 Gene Expression and Drug-Resistant Epilepsy. *Pediatr. Neurol.* **1999**, *21*, 731–734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Löscher, W.; Friedman, A. Structural, Molecular, and Functional Alterations of the Blood-brain Barrier during Epileptogenesis and Epilepsy: A Cause, Consequence, or Both? *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sisodiya, S.M.; Lin, W.R.; Harding, B.N.; Squier, M.V.; Thom, M. Drug Resistance in Epilepsy: Expression of Drug Resistance Proteins in Common Causes of Refractory Epilepsy. *Brain* **2002**, *125*, 22–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tishler, D.M.; Weinberg, K.I.; Hinton, D.R.; Barbaro, N.; Annett, G.M.; Raffel, C. MDR1 Gene Expression in Brain of Patients with Medically Intractable Epilepsy. *Epilepsia* **1995**, *36*, 1–6. [[CrossRef](#)]
- Fonseca-Barridos, D.; Pérez-Pérez, D.; Fuentes-Mejía, M.; Orozco-Suárez, S.; Alonso-Vanegas, M.; Martínez-Juárez, I.E.; Guevara-Guzmán, R.; Castañeda-Cabral, J.L.; Rocha, L. Protein Expression of P-Glycoprotein in Neocortex from Patients with Frontal Lobe Epilepsy. *Epilepsy Res.* **2022**, *181*, 106892. [[CrossRef](#)]
- Lazarowski, A.; Ramos, A.J.; García-Rivello, H.; Brasco, A.; Girardi, E. Neuronal and Glial Expression of the Multidrug Resistance Gene Product in an Experimental Epilepsy Model. *Cdl Mol. Neurobiol.* **2004**, *24*, 77–85. [[CrossRef](#)]

18. Marchi, N.; Hallene, K.L.; Kight, K.M.; Cucullo, L.; Moddel, G.; Bingaman, W.; Dini, G.; Vezzani, A.; Janigro, D. Significance of MDR1 and Multiple Drug Resistance in Refractory Human Epileptic Brain. *BMC Med.* **2004**, *2*, 37. [\[CrossRef\]](#)
19. Merelli, A.; Ramos, A.J.; Lazarowski, A.; Auzmendi, J. Convulsive Stress Mimics Brain Hypoxia and Promotes the P-Glycoprotein (P-Gp) and Erythropoietin Receptor Overexpression. Recombinant Human Erythropoietin Effect on P-Gp Activity. *Front Neurosci.* **2019**, *13*, 750. [\[CrossRef\]](#)
20. Wang, G.; Xie, G.; Han, L.; Wang, D.; Du, F.; Kong, X.; Su, G. Involvement of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  in the Upregulation of P-Glycoprotein in Refractory Epilepsy. *Neuroreport* **2019**, *30*, 1191–1196. [\[CrossRef\]](#)
21. Bauer, B.; Hartz, A.M.S.; Miller, D.S. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Endothelin-1 Increase P-Glycoprotein Expression and Transport Activity at the Blood-Brain Barrier. *Mol. Pharm.* **2007**, *71*, 667–675. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Bauer, B.; Hartz, A.M.S.; Peköc, A.; Toellner, K.; Miller, D.S.; Potschka, H. Seizure-Induced up-Regulation of P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier through Glutamate and Cyclooxygenase-2 Signaling. *Mol. Pharm.* **2008**, *73*, 1444–1453. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Bankstahl, J.P.; Hoffmann, K.; Bethmann, K.; Löscher, W. Glutamate Is Critically Involved in Seizure-Induced Overexpression of P-Glycoprotein in the Brain. *Neuropharmacology* **2008**, *54*, 1006–1016. [\[CrossRef\]](#)
24. Bateman, L.M.; Li, C.S.; Seyal, M. Ictal Hypoxemia in Localization-Related Epilepsy: Analysis of Incidence, Severity and Risk Factors. *Brain* **2008**, *131*, 3239–3245. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Das, A.; Wallace, G.C.; Holmes, C.; McDowell, M.L.; Smith, J.A.; Marshall, J.D.; Bonilha, L.; Edwards, J.C.; Glazier, S.S.; Ray, S.K.; et al. Hippocampal Tissue of Patients with Refractory Temporal Lobe Epilepsy Is Associated with Astrocyte Activation, Inflammation, and Altered Expression of Channels and Receptors. *Neuroscience* **2012**, *220*, 237–246. [\[CrossRef\]](#)
26. Doring, M.J.; Spencer, D.D. Extracellular Hippocampal Glutamate and Spontaneous Seizure in the Conscious Human Brain. *Lancet* **1993**, *341*, 1607–1610. [\[CrossRef\]](#)
27. Moseley, B.D.; Nickels, K.; Britton, J.; Wirrell, E. How Common Is Ictal Hypoxemia and Bradycardia in Children with Partial Complex and Generalized Convulsive Seizures? *Epilepsia* **2010**, *51*, 1219–1224. [\[CrossRef\]](#)
28. Vezzani, A.; Granata, T. Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence. *Epilepsia* **2005**, *46*, 1724–1743. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Besio, W.; Hadidi, R.; Makeyev, O.; Luna-Munguía, H.; Rocha, L. Electric Fields in Hippocampus Due to Transcranial Focal Electrical Stimulation via Concentric Ring Electrodes. In Proceedings of the 33rd Annual International Conference of the IEEE EMBS, Boston, MA, USA, 30 August–3 September 2011; pp. 5488–5491.
30. Besio, W.; Sharma, V.; Spaulding, J. The Effects of Concentric Ring Electrode Electrical Stimulation on Rat Skin. *Ann. Biomed. Eng.* **2010**, *38*, 1111–1118. [\[CrossRef\]](#)
31. Luby, M.D.; Makeyev, O.; Besio, W. Chronic Transcranial Focal Stimulation from Tripolar Concentric Ring Electrodes Does Not Disrupt Memory Formation in Rats. In Proceedings of the Annual Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Chicago, IL, USA, 26–30 August 2014; pp. 6139–6142.
32. Mucio-Ramírez, S.; Makeyev, O. Safety of the Transcranial Focal Electrical Stimulation via Tripolar Concentric Ring Electrodes for Hippocampal CA3 Subregion Neurons in Rats. *J. Heal. Eng* **2017**, *2017*, 4302810. [\[CrossRef\]](#)
33. van Oosterom, A.; Strackee, J. Computing the Lead Field of Electrodes with Axial Symmetry. *Med. Biol. Eng. Comput.* **1983**, *21*, 473–481. [\[CrossRef\]](#)
34. Besio, W.G.; Koka, K.; Cole, A.J. Effects of Noninvasive Transcutaneous Electrical Stimulation via Concentric Ring Electrodes on Pilocarpine-Induced Status Epilepticus in Rats. *Epilepsia* **2007**, *48*, 2273–2279. [\[CrossRef\]](#)
35. Besio, W.; Gale, K.N.; Medvedev, A.V. Possible Therapeutic Effects of Transcutaneous Electrical Stimulation via Concentric Ring Electrodes. *Epilepsia* **2010**, *51*, 85–87. [\[CrossRef\]](#)
36. Besio, W.; Liu, X. Transcutaneous Focal Electrical Stimulation via Concentric Ring Electrodes Reduces Synchrony Induced by Pentylentetrazole in Beta and Gamma Bands in Rats. *Int. J. Neural Syst.* **2011**, *21*, 139–149. [\[CrossRef\]](#)
37. Makeyev, O.; Luna-Munguía, H.; Rogel-Salazar, G.; Liu, X.; Besio, W. Noninvasive Transcranial Focal Stimulation via Tripolar Concentric Ring Electrodes Lessens Behavioral Seizure Activity of Recurrent Pentylentetrazole Administrations in Rats. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* **2013**, *21*, 383–390. [\[CrossRef\]](#)
38. Pérez-Pérez, D.; Castañeda-Cabral, J.L.; Orozco-Suárez, S.; Sotelo, J.; Besio, W.; Rocha, L. Noninvasive Transcranial Focal Stimulation Affects the Convulsive Seizure-Induced P-Glycoprotein Expression and Function in Rats. *Epilepsy Behav.* **2021**, *115*, 107659. [\[CrossRef\]](#)
39. Santana-Gómez, C.E.; Alcántara-González, D.; Luna-Munguía, H.; Bañuelos-Cabrera, I.; Magdaleno-Madrugal, V.M.; Fernández-Mas, R.; Besio, W.; Rocha, L. Transcranial Focal Electrical Stimulation Reduces the Convulsive Expression and Amino Acid Release in the Hippocampus during Pilocarpine-Induced Status Epilepticus in Rats. *Epilepsy Behav.* **2015**, *49*, 33–39. [\[CrossRef\]](#)
40. Valdés-Cruz, A.; Villasana-Salazar, B.; Williams, B.; Martínez-Vargas, D.; Magdaleno-Madrugal, V.M.; Almazán-Alvarado, S.; Besio, W. Transcranial Focal Electrical Stimulation via Concentric Ring Electrodes in Freely Moving Cats: Antiepileptogenic and Postictal Effects. *Exp. Neurol.* **2019**, *320*, 113012. [\[CrossRef\]](#)
41. Auzmendi, J.; Orozco-Suárez, S.; Bañuelos-Cabrera, I.; Eva González-Trujano, M.; Calixto González, E.; Rocha, L.; Lazarowski, A. P-Glycoprotein Contributes to Cell Membrane Depolarization of Hippocampus and Neocortex in a Model of Repetitive Seizures Induced by Pentylentetrazole in Rats. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 6732–6738. [\[CrossRef\]](#)
42. Hoffman, M.M.; Wei, L.-Y.; Roepe, P.D. Are Altered pH<sub>i</sub> and Membrane Potential in Hu MDR 1 Transfectants Sufficient to Cause MDR Protein-Mediated Multidrug Resistance? *J. Gen. Physiol.* **1996**, *108*, 295–313. [\[CrossRef\]](#)



43. Luz, J.G.; Wei, L.-Y.; Basu, S.; Roepe, P.D. Transfection of Mu MDR 1 Inhibits Na<sup>+</sup>-Independent Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub> Exchange in Chinese Hamster Ovary Cells. *Am. Chem. Soc.* **1994**, *33*, 7239–7248. [\[CrossRef\]](#)
44. Romsicki, Y.; Sharom, F.J. Phospholipid Flippase Activity of the Reconstituted P-Glycoprotein Multidrug Transporter. *Biochemistry* **2001**, *40*, 6937–6947. [\[CrossRef\]](#)
45. Valverde, M.A.; Díaz, M.; Sepúlveda, F.V.; Gill, D.R.; Hyde, S.C.; Higgins, C.F. Volume-Regulated Chloride Channels Associated with the Human Multidrug-Resistance P-Glycoprotein. *Nature* **1992**, *355*, 830–833. [\[CrossRef\]](#)
46. Blumenfeld, H.; Rivera, M.; Vasquez, J.G.; Shah, A.; Ismail, D.; Enev, M.; Zaveri, H.P. Neocortical and Thalamic Spread of Amygdala Kindled Seizures. *Epilepsia* **2007**, *48*, 254–262. [\[CrossRef\]](#)
47. Cavazos, J.E.; Golarai, G.; Sutula, T.P. Mossy Fiber Synaptic Reorganization Induced by Kindling: Time Course of Development, Progression, and Permanence. *J. Neurosci.* **1991**, *11*, 2795–2803. [\[CrossRef\]](#)
48. Hewapathirane, D.S.; Burnham, W.M.I. Propagation of Amygdala-Kindled Seizures to the Hippocampus in the Rat: Electroencephalographic Features and Behavioural Correlates. *Neurosci. Res.* **2005**, *53*, 369–375. [\[CrossRef\]](#)
49. Löscher, W.; Ebert, U. Basic Mechanisms of Seizure Propagation: Targets for Rational Drug Design and Rational Polypharmacy. *Epilepsy Res. Suppl.* **1996**, *11*, 17–43.
50. Paxinos, G.; Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2006; ISBN 9780080475158.
51. Löscher, W.; Rundfeldt, C. Kindling as a Model of Drug-Resistant Partial Epilepsy: Selection of Phenytoin-Resistant and Nonresistant Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, *258*, 483–489.
52. Racine, R.J. Modification of Seizures Activity by Electrical Stimulation: Motor Seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **1972**, *32*, 281–294. [\[CrossRef\]](#)
53. 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. Electroencephalographic Activity in Neonatal Ventral Hippocampus Lesion in Adult Rats. *Synapse* **2012**, *66*, 738–746. [\[CrossRef\]](#)
54. Ghosh, R.; Gilda, J.E.; Gomes, A.V. The Necessity of and Strategies for Improving Confidence in the Accuracy of Western Blots. *Expert Rev. Proteom.* **2014**, *11*, 549–560. [\[CrossRef\]](#)
55. Sakamoto, S.; Putalun, W.; Vimolmangkang, S.; Phoolcharoen, W.; Shoyama, Y.; Tanaka, H.; Morimoto, S. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Quantitative/Qualitative Analysis of Plant Secondary Metabolites. *J. Nat. Med.* **2018**, *72*, 32–42. [\[CrossRef\]](#)
56. Potschka, H.; Löscher, W. In Vivo Evidence for P-Glycoprotein-Mediated Transport of Phenytoin at the Blood-Brain Barrier of Rats. *Epilepsia* **2001**, *42*, 1231–1240. [\[CrossRef\]](#)
57. Potschka, H.; Fedrowitz, M.; Löscher, W. P-Glycoprotein and Multidrug Resistance-Associated Protein Are Involved in the Regulation of Extracellular Levels of the Major Antiepileptic Drug Carbamazepine in the Brain. *Neuroreport* **2001**, *12*, 3557–3560. [\[CrossRef\]](#)
58. Potschka, H.; Fedrowitz, M.; Löscher, W. P-Glycoprotein-Mediated Efflux of Phenobarbital, Lamotrigine, and Felbamate at the Blood-Brain Barrier: Evidence from Microdialysis Experiments in Rats. *Neurosci. Lett.* **2002**, *327*, 173–176. [\[CrossRef\]](#)
59. Wang, Y.; Xu, Z.; Cheng, H.; Guo, Y.; Xu, C.; Wang, S.; Zhang, J.; Ding, M.; Chen, Z. Low-Frequency Stimulation Inhibits Epileptogenesis by Modulating the Early Network of the Limbic System as Evaluated in Amygdala Kindling Model. *Brain Struct. Funct.* **2014**, *219*, 1685–1696. [\[CrossRef\]](#)
60. Dalsgaard, M.K.; Madsen, F.F.; Secher, N.H.; Laurson, H.; Quistorff, B. High Glycogen Levels in the Hippocampus of Patients with Epilepsy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2007**, *27*, 1137–1141. [\[CrossRef\]](#)
61. Diemel, G.A.; Gillinder, L.; McGonigal, A.; Borges, K. Potential New Roles for Glycogen in Epilepsy. *Epilepsia* **2023**, *64*, 29–53. [\[CrossRef\]](#)
62. Rothman, D.L.; Diemel, G.A.; Behar, K.L.; Hyder, E.; DiNuzzo, M.; Giove, F.; Mangia, S. Glucose Sparing by Glycogenolysis (GSG) Determines the Relationship between Brain Metabolism and Neurotransmission. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2022**, *42*, 844–860. [\[CrossRef\]](#)
63. DiNuzzo, M.; Giove, F.; Maraviglia, B.; Mangia, S. Computational Flux Balance Analysis Predicts That Stimulation of Energy Metabolism in Astrocytes and Their Metabolic Interactions with Neurons Depend on Uptake of K<sup>+</sup> Rather than Glutamate. *Neurochem. Res.* **2017**, *42*, 202–216. [\[CrossRef\]](#)
64. Rahman, B.; Kussmaul, L.; Hamprecht, B.; Dringen, R. Glycogen Is Mobilized during the Disposal of Peroxides by Cultured Astroglial Cells from Rat Brain. *Neurosci. Lett.* **2000**, *290*, 169–172. [\[CrossRef\]](#)
65. Swanson, R.A.; Choi, D.W. Glial Glycogen Stores Affect Neuronal Survival during Glucose Deprivation in Vitro. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1993**, *13*, 162–169. [\[CrossRef\]](#)
66. Rocha, L.; Briones, M.; Ackermann, R.F.; Anton, B.; Maidment, N.T.; Evans, C.J.; Engel, J. Pentylentetrazol-Induced Kindling: Early Involvement of Excitatory and Inhibitory Systems. *Epilepsy Res.* **1996**, *26*, 105–113. [\[CrossRef\]](#)
67. Minamoto, Y.; Itano, T.; Tokuda, M.; Matsui, H.; Janjua, N.A.; Hosokawa, K.; Okada, Y.; Murakami, T.H.; Negi, T.; Hatase, O. In Vivo Microdialysis of Amino Acid Neurotransmitters in the Hippocampus in Amygdaloid Kindled Rat. *Brain Res.* **1992**, *573*, 345–348. [\[CrossRef\]](#)
68. Corcoran, M.E.; Urstad, H.; Mccaughan, J.A.; Wada, J.A. Frontal Lobe and Kindling in the Rat. *Can. J. Neurol. Sci./J. Can. Des Sci. Neurol.* **1975**, *2*, 501–508. [\[CrossRef\]](#)

69. Batten, S.R.; Matveeva, E.A.; Whiteheart, S.W.; Vanaman, T.C.; Gerhardt, G.A.; Slevin, J.T. Linking Kindling to Increased Glutamate Release in the Dentate Gyrus of the Hippocampus through the STXBPS/Tomosyn-1 Gene. *Brain Behav.* **2017**, *7*, e00795. [[CrossRef](#)]
70. Kaura, S.; Bradford, H.F.; Young, A.M.J.; Croucher, M.J.; Hughes, P.D. Effect of Amygdaloid Kindling on the Content and Release of Amino Acids from the Amygdaloid Complex: In Vivo and In Vitro Studies. *J. Neurochem.* **1995**, *65*, 1240–1249. [[CrossRef](#)]
71. Luna-Munguia, H.; Orozco-Suarez, S.; Rocha, L. 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* **2011**, *61*, 807–814. [[CrossRef](#)]
72. Czornyj, L.; Auzmendi, J.; Lazarowski, A. Transporter Hypothesis in Pharmacoresistant Epilepsies Is It at the Central or Peripheral Level? *Epilepsia Open* **2021**, *7*, S34–S46. [[CrossRef](#)]
73. Seegers, U.; Potschka, H.; Löscher, W. Expression of the Multidrug Transporter P-Glycoprotein in Brain Capillary Endothelial Cells and Brain Parenchyma of Amygdala-Kindled Rats. *Epilepsia* **2002**, *43*, 675–684. [[CrossRef](#)]
74. Volk, H.; Potschka, H.; Löscher, W. Increased Expression of the Multidrug Transporter P-Glycoprotein in Limbic Brain Regions after Amygdala-Kindled Seizures in Rats. *Epilepsy Res.* **2004**, *58*, 67–79. [[CrossRef](#)]
75. Volk, H.; Potschka, H.; Löscher, W. Immunohistochemical Localization of P-Glycoprotein in Rat Brain and Detection of Its Increased Expression by Seizures Are Sensitive to Fixation and Staining Variables. *J. Histochem. Cytochem.* **2005**, *53*, 517–531. [[CrossRef](#)]
76. Peterson, D.W.; Collins, J.E.; Bradford, H.F. The kindled amygdala model of epilepsy: Anticonvulsant action of amino acid antagonists. *Brain Res.* **1983**, *275*, 169–172. [[CrossRef](#)]
77. Sato, K.; Morimoto, K.; Okamoto, M. Anticonvulsant action of a non-competitive antagonist of nmda receptors (MK-801) in the kindling model of epilepsy. *Brain Res.* **1988**, *463*, 12–20. [[CrossRef](#)]
78. Bikson, M.; Lian, J.; Hahn, P.J.; Stacey, W.C.; Sciortino, C.; Durand, D.M. Suppression of Epileptiform Activity by High Frequency Sinusoidal Fields in Rat Hippocampal Slices. *J. Physiol.* **2001**, *531*, 181–191. [[CrossRef](#)]
79. Jensen, A.L.; Durand, D.M. High Frequency Stimulation Can Block Axonal Conduction. *Exp. Neurol.* **2009**, *220*, 57–70. [[CrossRef](#)]
80. Pérez-Pérez, D.; Feria-Romero, I.; Besio, W.; Rocha, L.; Bautista-Orozco, L.; Orozco-Suárez, S. Transcranial Focal Stimulation Modifies the Genetic Expression in the Cerebral Cortex and the Hippocampus of Healthy Rats. *Res. Sq.* **2022**. [[CrossRef](#)]
81. Liu, Y.; Wang, Y.; Xu, Z.; Xu, C.; Ying, X.; Wang, S.; Zhang, S.; Xiao, B.; Chen, Z. Consecutive 15 Min Is Necessary for Focal Low Frequency Stimulation to Inhibit Amygdaloid-Kindling Seizures in Rats. *Epilepsy Res.* **2013**, *106*, 47–53. [[CrossRef](#)]
82. Wu, D.C.; Xu, Z.H.; Wang, S.; Fang, Q.; Hu, D.Q.; Li, Q.; Sun, H.L.; Zhang, S.H.; Chen, Z. Time-Dependent Effect of Low-Frequency Stimulation on Amygdaloid-Kindling Seizures in Rats. *Neurobiol. Dis.* **2008**, *31*, 74–79. [[CrossRef](#)]
83. Feldmann, M.; Asselin, M.C.; Liu, J.; Wang, S.; McMahon, A.; Anton-Rodriguez, J.; Walker, M.; Symms, M.; Brown, G.; Hinz, R.; et al. P-Glycoprotein Expression and Function in Patients with Temporal Lobe Epilepsy: A Case-Control Study. *Lancet Neurol.* **2013**, *12*, 777–785. [[CrossRef](#)]
84. Elkhayat, H.A.; Aly, R.H.; Elagouza, I.A.; El-Kabarity, R.H.; Galal, Y.I. Role of P-Glycoprotein Inhibitors in Children with Drug-Resistant Epilepsy. *Acta Neurol. Scand.* **2017**, *136*, 639–644. [[CrossRef](#)]
85. Asadi-Pooya, A.A.; Stewart, G.R.; Abrams, D.J.; Sharan, A. Prevalence and Incidence of Drug-Resistant Mesial Temporal Lobe Epilepsy in the United States. *World Neurosurg.* **2017**, *99*, 662–666. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.