



AUTORIZACIÓN PARA LA DIFUSIÓN DE TESIS DIGITAL

Ciudad de México, 26 de diciembre de 2023

Por este medio, manifiesto ser el autor de la tesis
Efecto del Levetiracetam Sobre la Glía en el Hipocampo de Ratas con Epilepsia del Lóbulo

Temporal

De la cual ostento la titularidad de los derechos morales y patrimoniales sobre la misma, de conformidad con los artículos 18 y 25 de la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) Así mismo, libero al INP de toda responsabilidad presente o futura que pudiera afectar los intereses de terceros.

Por lo anterior

Autorizo X No autorizo _____

Al Centro de Información y Documentación Científica, su difusión en nuestro **Repositorio Institucional** para efectos de consulta abierta.

TODO EL MATERIAL CONTENIDO EN ESTA TESIS ESTÁ PROTEGIDO POR La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos México)

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Nombre de Autor (letra de molde) Gerson Jafet Cruz Atzin

Nombre de Tutor (letra de molde) Julieta Griselda Mendoza Torreblanca

Firma: [Firma]
Sustentante

Firma: [Firma]
Tutor de Jesús





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura en Biología Experimental

REPORTE FINAL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**“Efecto del Levetiracetam Sobre la Glía en el
Hipocampo de Ratas con Epilepsia del
Lóbulo Temporal”**

Presenta:

Gerson Jafet Cruz Atzín

Asesora interna

Dra. Beatriz Gómez González
Universidad Autónoma Metropolitana

Asesora Externa

Dra. Julieta Griselda Mendoza Torreblanca
Instituto Nacional de Pediatría

Ciudad de México, octubre , 2022

Este proyecto formó parte del protocolo “Evaluación del efecto neuroprotector, antioxidante y antiinflamatorio del levetiracetam en ratas con epilepsia del lóbulo temporal” con número de registro INP 2022/048.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), por la disposición de equipos de cómputo para realizar este escrito y el análisis de resultados, así como por el otorgamiento de becas. Al Instituto Nacional de Pediatría (INP), por la disposición de animales de experimentación, reactivos y materiales necesarios.

A la Dra. Itzel Jatziri Contreras García, por el acercamiento a la neurobiología, por todas las enseñanzas dadas durante mi estancia en el INP, las exigencias, por siempre estar dispuesta a ayudarme y por el tiempo dedicado a este proyecto.

A la Dra. Julieta Griselda Mendoza Torreblanca, por aceptarme en el instituto, por siempre otorgar los materiales y reactivos necesarios para trabajar, por las enseñanzas, por la disposición de ayudarme cuando lo necesitaba y por el tiempo dedicado a este proyecto.

A Isabel, por ser una gran amiga y compañera de laboratorio, con la que he compartido muchas experiencias dentro y fuera del INP, así como por su ayuda durante la realización de éste proyecto.

A la Dra. Beatriz Gómez González por haber aceptado asesorar este proyecto de investigación.

A la Téc. Sara Navarrete y a la Quím. Edna García, por toda la ayuda brindada durante mi estancia en el INP.

Dedicatorias

Este trabajo se lo dedico principalmente a mis padres (*Rosario y Julio*), que son los pilares más importantes en mi vida, y que con su amor me han enseñado que la familia es algo importante. Los amo infinitamente.

A mis hermanos (*Nahu y Lenin*), con los que he compartido muchos momentos a lo largo de mi vida, y que siempre me han brindado ayuda cuando más la he necesitado.

A mis sobrinos (*Ángel y Eidelyn*), que quiero y amo con todo mi ser. A mi niño, el *Puchillón*, que aunque nunca leerá esto, su existencia me hace muy feliz.

A mi mejor amiga, *Abril*, con la que he compartido muchas experiencias a lo largo de estos años, he reído y llorado a su lado, y espero que sean más años juntos.

A *Luis*, con el que he compartido gran parte de lo que soy, y que se ha vuelto una persona muy especial en mi vida.

A *Maday*, mi primer amiga de la licenciatura, que me adoptó en su grupo de amigos, y que me ha mostrado que la perseverancia nos lleva a grandes cosas.

A mis queridísimos Darks (*Fanny, Rick, Brenda y Alexis*). Siempre serán una etapa en la que fui feliz y no lo sabía. Un placer coincidir con ustedes.

A la Dra. Jatziri y a la Dra. Julieta, por todas las enseñanzas, la ayuda, su disposición, las exigencias, y por creer en mí.

A la Bio. Exp. Alma Hernández, por el acercamiento al maravilloso mundo de la biología, por creer en mí desde la prepa, por ser una excelente profesora y ser humano. Donde quiera que esté, siempre la llevaré conmigo.

A Daniel, por el apoyo otorgado durante el comienzo y el final de este trabajo, por ser una gran persona y amigo.

A todos mis amigos en general, que me apoyaron y creyeron en mí.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 7 |
| ABREVIATURAS | 8 |
| INTRODUCCIÓN | 10 |
| 1. Epilepsia. | 10 |
| 1.1. Clasificación de la epilepsia. | 10 |
| 1.2. Crisis epilépticas. | 12 |
| 2. Epilepsia del lóbulo temporal. | 13 |
| 3. Modelo animal de ELT. | 14 |
| 4. Glía. | 15 |
| 4.1. Neuroinflamación. | 17 |
| 4.2. Neuroinflamación y epilepsia. | 19 |
| 5. Levetiracetam. | 20 |
| 5.1. Efecto antiinflamatorio del levetiracetam | 21 |
| Planteamiento del problema | 21 |
| Justificación | 22 |
| Objetivos | 22 |
| General: | 22 |
| Específicos: | 22 |
| Hipótesis | 22 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 23 |
| Diseño experimental | 23 |
| Población, criterios de inclusión, exclusión y eliminación | 24 |
| Inducción del estado epiléptico | 25 |
| Tratamiento con levetiracetam e implantación de las minibombas | 25 |
| Obtención de muestras del tejido | 26 |
| Inmunohistoquímicas | 26 |
| Montaje de las muestras | 27 |
| Cuantificación celular | 27 |
| Pruebas estadísticas realizadas | 28 |
| RESULTADOS | 28 |
| Inmunotinción para GFAP | 28 |
| Inmunotinción para Iba-1 | 34 |
| DISCUSIÓN | 38 |

CONCLUSIONES

40

BIBLIOGRAFÍA

41

RESUMEN

La epilepsia es una enfermedad cerebral crónica que afecta a alrededor de 50 millones de personas en el mundo, siendo la epilepsia del Lóbulo temporal (ELT), la epilepsia focal más común. La ELT es un tipo de epilepsia que afecta estructuras del lóbulo temporal y que tiene como característica la esclerosis hipocámpal.

Se sabe que células de la glía, como la astrogliá y la microglía, tienen una participación en la neuroinflamación, ya que liberan citocinas proinflamatorias que permiten la progresión de dicho proceso; sin embargo, la neuroinflamación excesiva puede alterar la excitabilidad neuronal, contribuyendo así a la aparición de crisis espontáneas recurrentes.

El levetiracetam (LEV) es un fármaco antiepiléptico eficaz para el control de las crisis epilépticas, que ha presentado un efecto antiinflamatorio. Se ha reportado una disminución en la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias en ratas y ratones epilépticos tratados con LEV, respecto a los epilépticos, sin embargo, el efecto que puede tener sobre la astrogliá y la microglía durante la fase crónica de la epilepsia sigue siendo un tema de investigación, por lo que en este estudio, el objetivo principal consistió en determinar el efecto del LEV sobre dichos tipos celulares en el hipocampo de ratas con ELT.

Para cumplir con el objetivo de este trabajo, se indujo el estado epiléptico (EE) en ratas Wistar, las cuales, dos meses posteriores a esta inducción, fueron tratadas con LEV durante una semana, para su posterior sacrificio y obtención de muestras, con las que se realizaron inmunohistoquímicas para evaluar la inmunorreactividad a GFAP e Iba-1. En el hipocampo de ratas epilépticas se observó un mayor número de astrocitos, mientras que las ratas epilépticas tratadas con LEV mostraron una disminución en la cantidad de astrocitos con respecto a las epilépticas, indicando que el LEV revierte la astrogliosis que ocurre durante la fase crónica de la ELT. Por otro lado, en este estudio, no se reportan diferencias entre la cantidad de microglía entre los diferentes grupos analizados.

ABREVIATURAS

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico.

BHE: Barrera hematoencefálica.

CCL-2: Ligando 2 de quimiocina

CER: Convulsiones espontáneas recurrentes.

CTRL: Grupo control.

CTRL+LEV: Grupo control tratado con LEV.

DAB: 3,3'-diaminobencidina.

EE: Estado epiléptico.

EEG: Electroencefalograma.

EH: Esclerosis hipocampal.

ELT: Epilepsia del lóbulo temporal.

EPI: Grupo epiléptico.

EPI+LEV: Grupo epiléptico tratado con LEV.

FAEs: Fármacos antiepilépticos.

GABA: Ácido-gamma-aminobutírico.

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

Iba-1: Molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1.

IL-1 β : Interleucina 1 beta.

IL-1RI: Receptor tipo I de interleucina 1.

IL-2: Interleucina 2.

IL-6: Interleucina 6.

IL-7: Interleucina 7.

ILAE: International League Against Epilepsy.

i.m.: Intramuscular.

INP: Instituto Nacional de Pediatría.

i.p.: Intraperitoneal.

LEV: Levetiracetam.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MRI: Imagen por resonancia magnética.

NFkB: Factor nuclear κ potenciador de la cadena ligera de las células B activadas.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NO: Óxido nítrico.

PBS: Amortiguador de fosfatos.

PBT: Amortiguador de fosfatos con tritón.

SNC: Sistema nervioso central.

SV2A: Proteína de vesícula sináptica 2A

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

SV2A: Proteína de vesículas sinápticas 2A.

INTRODUCCIÓN

1. Epilepsia.

La epilepsia es una enfermedad cerebral crónica, la cual tiene como característica la predisposición a la ocurrencia de crisis epilépticas, así como a las consecuencias psicológicas, sociales, cognitivas y neurobiológicas que estas conllevan. Para diagnosticar que un paciente presenta epilepsia se necesita la presencia de al menos dos crisis no provocadas (Fisher et al., 2014; Sirven & Osborne, 2014).

La epilepsia afecta a más de 50 millones de personas alrededor del mundo. La incidencia de esta enfermedad, en países desarrollados, se encuentra entre 42 y 61 pacientes por cada 100 000 habitantes, mientras que, en los países en desarrollo, la cifra de incidencia es el doble o más que la de los países desarrollados. En México, la prevalencia se encuentra entre 349 y 680 pacientes por cada 100 000 habitantes en la población en general, sin embargo, en la población infantil, dicha cifra se encuentra entre 180 a 400 pacientes por cada 100 000 habitantes (Cruz-Cruz et al., 2017).

Las crisis epilépticas se generan debido a descargas eléctricas excesivas de grupos neuronales que se pueden encontrar presentes en cualquier parte del cerebro. Estas crisis pueden tener una duración breve, sin embargo, también pueden ser duraderas, e incluso severas, y la frecuencia de estos episodios puede variar, desde crisis repetidas en un día hasta una crisis anual (WHO, 2022).

La epilepsia puede originarse debido a factores estructurales, genéticos, infecciosos, metabólicos, inmunes y, hasta el 50% de los casos de epilepsia en el mundo, tiene una causa desconocida (Devinsky et al., 2018) (Figura 1).

1.1. Clasificación de la epilepsia.

La International League Against Epilepsy (ILAE), de acuerdo con diferentes ámbitos clínicos, clasifica a los tipos de epilepsia en multiniveles de acuerdo con el origen de las crisis. Por lo tanto, en el primer nivel se encuentran clasificadas las crisis, las cuales pueden ser de origen focal, generalizado o desconocido. En el segundo nivel

se clasifica a la epilepsia de acuerdo con el tipo de crisis que presenta el paciente, en este sentido, al igual que las crisis, la epilepsia puede clasificarse en focal, generalizada, desconocida y combinada (Devinsky et al., 2018). En el tercer nivel se encuentra el síndrome epiléptico, el cual puede presentar diversas características, como alteraciones en el electroencefalograma (EEG), regiones del cerebro involucradas, frecuencia de las crisis, entre otras, con las cuales se puede recabar información para definir qué medicamentos o tratamientos serán de una mejor utilidad para el paciente (Scheffer et al., 2017) (Figura 1).

La epilepsia focal involucra crisis unifocales y multifocales que se producen en un solo hemisferio, mientras que la epilepsia generalizada se caracteriza por que la actividad anormal de las neuronas cuenta con una amplia distribución en ambos hemisferios cerebrales. Asimismo, se encuentra la epilepsia que presenta crisis focales secundariamente generalizadas, las cuales ocurren cuando las crisis focales, después de un tiempo, comienzan a propagarse hacia áreas cercanas, hasta que eventualmente se involucra a todo el cerebro (Devinsky et al., 2018; Izquierdo, 2005).

Se clasifica epilepsia combinada, cuando de manera sincrónica se presentan crisis de tipo focales y de tipo generalizadas. Además, cuando la epilepsia no puede ser clasificada como focal o generalizada, a causa de falta de información, se denomina epilepsia de tipo desconocida (Figura 1).

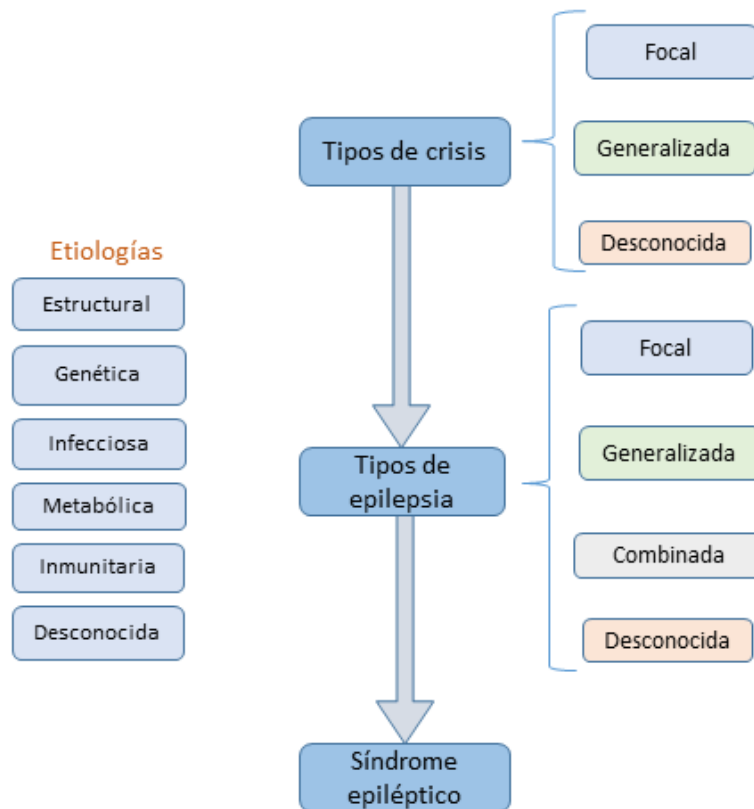


Figura 1. Clasificación de la epilepsia. La epilepsia, de acuerdo con la ILAE, puede ser determinada gracias a los 3 niveles en los que se encuentra clasificada, siendo el nivel uno el tipo de crisis que presenta el paciente, mientras que el nivel dos y tres pueden ser evaluados a través de estudios de imagen y electroencefalograma (EEG).

1.2. Crisis epilépticas.

Como se mencionó anteriormente, las crisis epilépticas se pueden clasificar de acuerdo con el sitio donde tiene inicio la actividad neuronal anormal, y pueden ser de origen focal, generalizado o desconocido. Las crisis focales, tienen su origen en una región específica del cerebro, mientras que, en las crisis con origen generalizado, la actividad neuronal exacerbada comienza de manera simultánea en ambos hemisferios cerebrales, presentando manifestaciones clínicas que van desde una breve alteración de la conciencia hasta movimientos espasmódicos en las extremidades, acompañados por pérdida de la postura y de la conciencia. Finalmente, las crisis de origen desconocido, son las crisis de las que se desconoce el sitio de origen de la actividad neuronal anormal (Scheffer et al., 2017).

Las crisis epilépticas presentan dos fenómenos importantes, la hipersincronía y la hiperexcitabilidad. La hipersincronía es el reclutamiento de un gran número de neuronas las cuales se encuentran hiperexcitadas, es decir, presentan un patrón de disparo anormal, aumentando con ello la excitabilidad de las redes neuronales (Stafstrom, 2010).

Las crisis epilépticas al no ser controladas pueden producir neurodegeneración, pérdida neuronal, recrecimiento axonal, neurogénesis anormal, reestructuración de redes neuronales y gliosis. Todo lo anterior puede darse de una manera progresiva (Feria-Romero et al., 2013).

2. Epilepsia del lóbulo temporal.

Se estima que de cada 10 personas con epilepsia, 6 presentan epilepsia del lóbulo temporal (ELT), la cual se caracteriza porque las crisis comienzan en estructuras del lóbulo temporal, tales como hipocampo, amígdala cerebral y región parahipocampal; eventualmente, estas crisis pueden involucrar a ambos lóbulos, siendo este tipo de epilepsia, la epilepsia focal más común, asimismo, una gran cantidad de pacientes con ELT pueden desarrollar tolerancia a los fármacos antiepilépticos (FAEs) (Klein & Tyrlikova, 2020; Thom, 2014).

Este tipo de epilepsia tiene como característica patológica y morfológica la esclerosis hipocampal (EH), la cual se ha asociado con una pérdida neuronal en las regiones de CA1 y CA3 del hipocampo y de manera subsecuente la aparición de gliosis, la cual se define como un incremento en la proliferación de células astrogliales y microgliales (Engel, 1996; López-Hernández & Solís, 2012).

Para el diagnóstico de ELT se han utilizado las imágenes por resonancia magnética (MRI), y con ello, se ha reportado que pacientes con este tipo de epilepsia tienen una reducción en el volumen del hipocampo, así como una alteración en su estructura interna, ya que la pérdida neuronal es reemplazada por células gliales. La determinación del diagnóstico histopatológico de EH, se realiza a través de la evaluación de la pérdida neuronal y del incremento de la gliosis fibrilar crónica, fenómenos observados en la capa piramidal del hipocampo. Asimismo, entre las alteraciones que se pueden producir en la ELT se encuentran la formación de circuitos

aberrantes en la sinapsis del hipocampo, dispersión de células granulares, alteración en las interneuronas y reinervación de las fibras musgosas (Malmgren & Thom, 2012).

3. Modelo animal de ELT.

Por lo general, para realizar estudios de la fisiopatología de la epilepsia, se utilizan modelos animales, con los que se pueden reproducir algunos de los signos de la epilepsia humana como los cambios producidos a nivel del EEG, así como la presencia de crisis epilépticas.

Un modelo ampliamente utilizado, es el modelo animal de ELT inducido con litio-pilocarpina. Este modelo presenta un periodo agudo, en el que se provoca el daño cerebral a través de la inducción del estado epiléptico (EE) por medio de la administración de pilocarpina, posteriormente, el periodo en el que el animal se encuentra libre de crisis, y que puede durar entre 4 y 44 días se denomina epileptogénesis, finalmente se encuentra la fase crónica, etapa en donde ocurre la aparición de crisis espontáneas recurrentes (CER). En este modelo, los animales desarrollan lesiones que, de manera principal, afectan la formación hipocampal, la amígdala, tálamo y corteza piriforme, además de producir la reinervación de las fibras musgosas (axones de las células granulares hipocampales), la cual se encuentra asociada con la formación de un circuito excitador reverberante, que a su vez, se ha propuesto que predispone la presencia de las CER en los animales (Clifford et al., 1987; Faure et al., 2013).

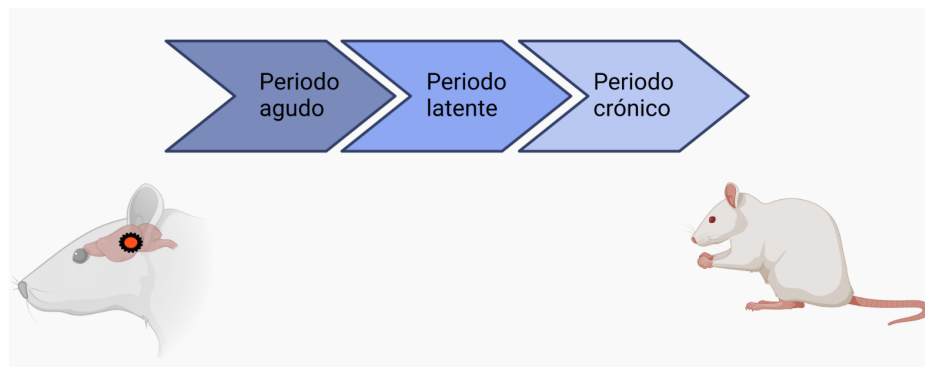


Figura 2. Modelo animal de epilepsia del lóbulo temporal inducido con litio-pilocarpina. En este modelo animal hay tres periodos importantes, el agudo, donde se genera la lesión inicial con la administración de la pilocarpina; el latente, el cual es el periodo libre de convulsiones, en donde se

generan los cambios reestructurales que dará paso a la epilepsia *per se*, y finalmente el periodo crónico, en el que se presenta la aparición de convulsiones espontáneas recurrentes (CER).

4. Glía.

En el cerebro se encuentran presentes dos tipos de células, las neuronas y las células gliales. Las neuronas son aquellas células que se encargan de la transmisión de impulsos nerviosos, así como del procesamiento de la información, mientras que las células gliales participan en diferentes funciones que mantienen al cerebro en homeostasis; existen varios tipos de células gliales, tales como la astrogliá y microglía (Jessen, 2004).

Las células astrogliales, también denominadas astrocitos, son las células gliales más abundantes, de las cuales, algunas pueden hacer contacto con los vasos sanguíneos del cerebro, participando en la formación de la barrera hematoencefálica (BHE), asimismo, otras células astrogliales pueden modificar la transmisión sináptica, ya que pueden remover un exceso de neurotransmisores liberados en las terminaciones nerviosas (Jessen, 2004; Sofroniew & Vinters, 2010; Vasile et al., 2017) (Figura 3).

De acuerdo con la ubicación y la morfología de los astrocitos, estos pueden ser clasificados en protoplasmáticos y fibrosos. Los astrocitos protoplasmáticos se encuentran presentes en la materia gris, y los procesos presentan una morfología ramificada, lo que le otorga una forma globoide, mientras que los astrocitos fibrosos se encuentran presentes en la materia blanca y los procesos tienen una forma alargada, similar a fibras (Sofroniew & Vinters, 2010).

Los astrocitos expresan transportadores para el glutamato, para el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y para glicina, lo que permite la captura de estos neurotransmisores desde el espacio sináptico, y una vez dentro del astrocito pueden ser modificados por enzimas especializadas para su posterior utilización (Sofroniew & Vinters, 2010).

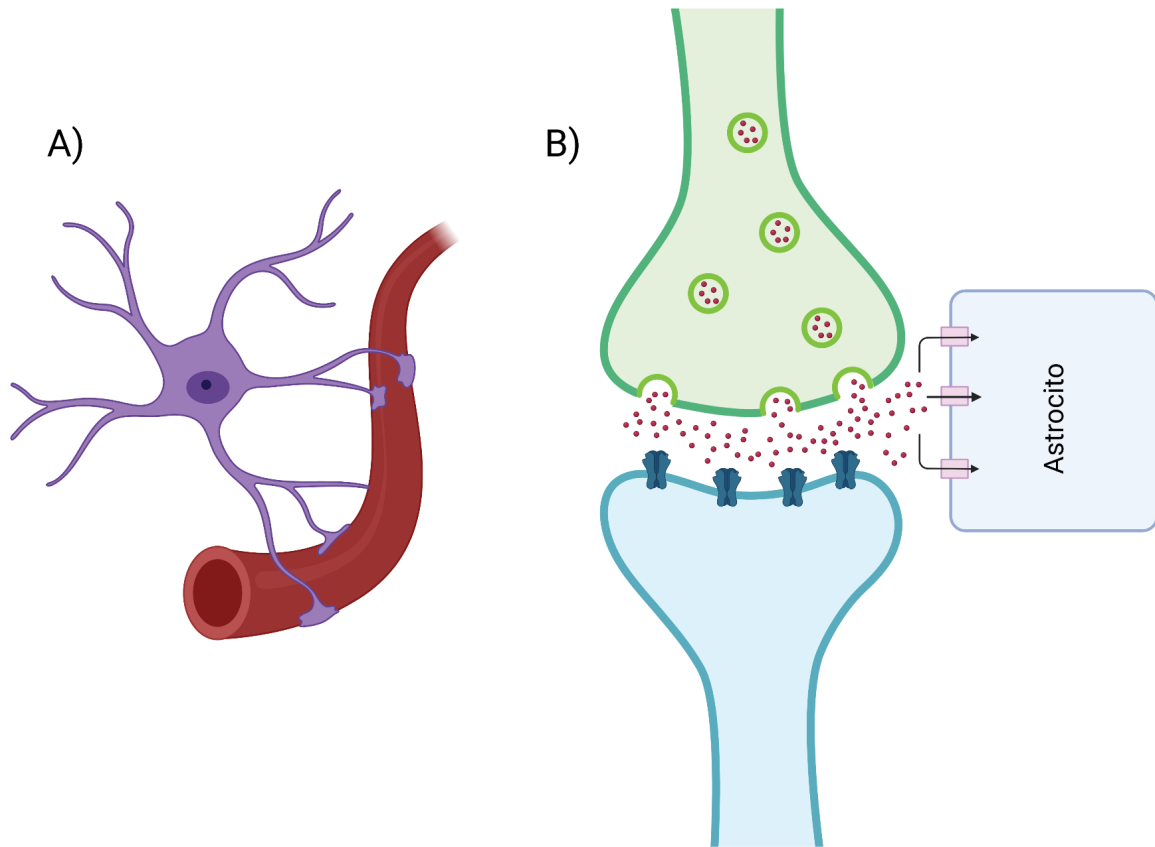


Figura 3. Principales funciones de los astrocitos. A) Los astrocitos se pueden encontrar en contacto con los vasos sanguíneos del cerebro, participando en la formación de la barrera hematoencefálica. B) Además, los astrocitos expresan transportadores para algunos neurotransmisores, los cuales son capturados hacia el interior para su modificación a través de enzimas específicas.

Por otro lado, la microglía es el macrófago residente del sistema nervioso central (SNC); estas células se mantienen inactivas en condiciones fisiológicas; en este estado, la microglía vigila el microambiente gracias a sus numerosos procesos que extiende y retrae (Wake et al., 2011).

En condiciones patológicas, la microglía se activa, con lo que dirige sus procesos hacia la zona del cerebro que se encuentra afectada. Dicha activación incrementa la liberación de factores neurotróficos por parte de la microglía, así como de citocinas proinflamatorias, como interleucina 7 (IL-7), interleucina 1 β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), las cuales pueden modificar los circuitos neuronales, contribuyendo con el progreso de enfermedades neurodegenerativas (Parkhurst & Gan, 2010; Wake et al., 2011) (Figura 4).

Una función importante de las células microgliales es su participación en la remoción de las células apoptóticas en los tejidos, sin embargo, se ha reportado que también son responsables de desencadenar procesos apoptóticos en neuronas debido a la liberación de citocinas proinflamatorias, como las anteriormente mencionadas (Wake et al., 2011) (Figura 4).

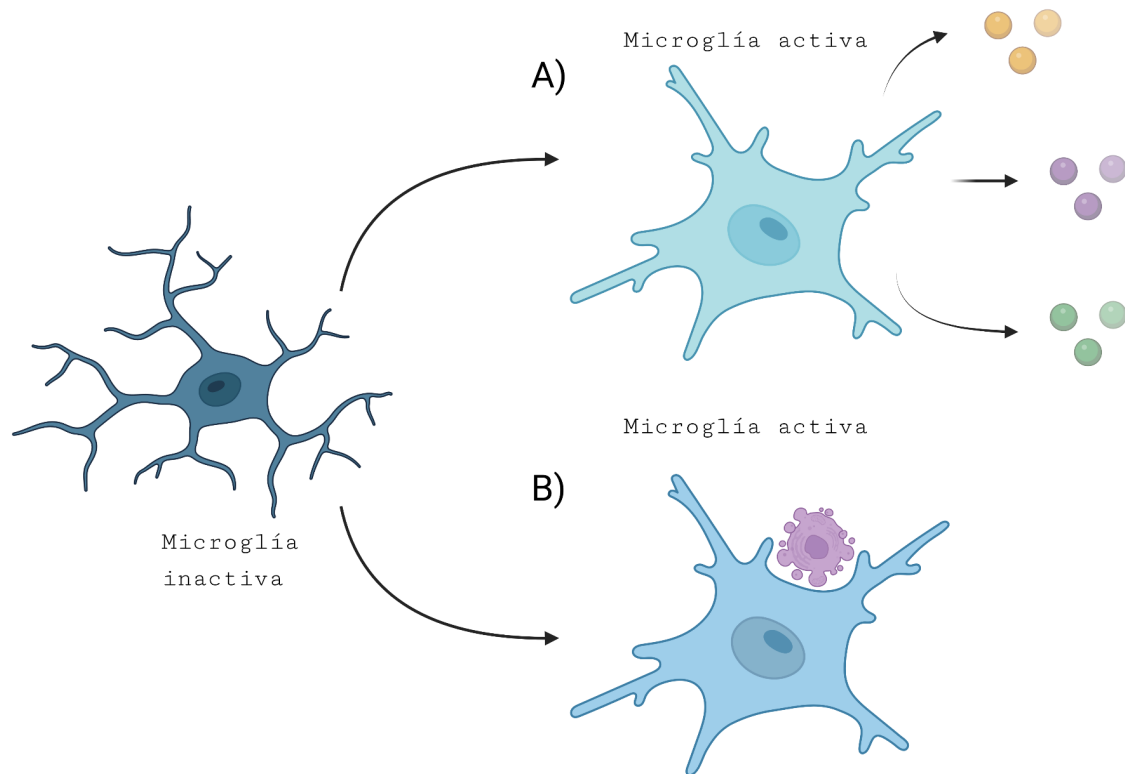


Figura 4. Activación de la microglía. En condiciones patológicas la microglía es activada. A) Una vez activa, la microglía puede liberar factores neurotróficos y citocinas proinflamatorias. B) Asimismo, presenta un papel en la remoción de células apoptóticas.

4.1. Neuroinflamación.

La neuroinflamación es un proceso que, normalmente, participa en el combate contra agentes patógenos, así como en procesos de reparación de tejidos, sin embargo, una neuroinflamación excesiva, es decir, en condiciones patológicas, produce efectos citotóxicos, y contribuye a efectos neurodegenerativos, como el incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, activación y migración de la glía, la cual libera citocinas que sirven como mediadores entre células del sistema inmune

(neutrófilos y monocitos) y células del SNC (López-Meraz et al., 2016; Webster et al., 2017).

La microglía tiene una participación en la neuroinflamación debido a que al ser activada libera citocinas como TNF- α y IL-1 β , asimismo, expresa receptores como ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA), P2 purinoreceptores y receptores del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que al activarse producen cascadas de señalización, que a su vez se relacionan con quimiotaxis celular, activación glial y fagocitosis (Parkhurst & Gan, 2010; Wake et al., 2011).

Asimismo, la astrogliía se relaciona con promotores reparadores de tejidos del SNC, además participa en la neuroinflamación debido a que libera citocinas proinflamatorias, como interleucina 6 (IL-6), ligando 2 de quimiocina (CCL-2) y GM-CSF (Webster et al., 2017).

Los astrocitos pueden presentar una respuesta inflamatoria causada por la liberación de citocinas proinflamatorias liberadas por la microglía, que al hacer contacto con sus receptores en la membrana astrocítica, inducen que el factor nuclear κ potenciador de la cadena ligera de las células B activadas (NF κ B) sea translocado al núcleo, dando inicio a una respuesta transcripcional, a través de la cual el astrocito sintetiza y libera más citocinas proinflamatorias que permiten la progresión de la neuroinflamación, asimismo, en condiciones patológicas contribuye a la muerte neuronal a través de una liberación excesiva de glutamato, y liberación de óxido nítrico (NO) (Giovannoni & Quintana, 2020; Linnerbauer et al., 2020) (Figura 5).

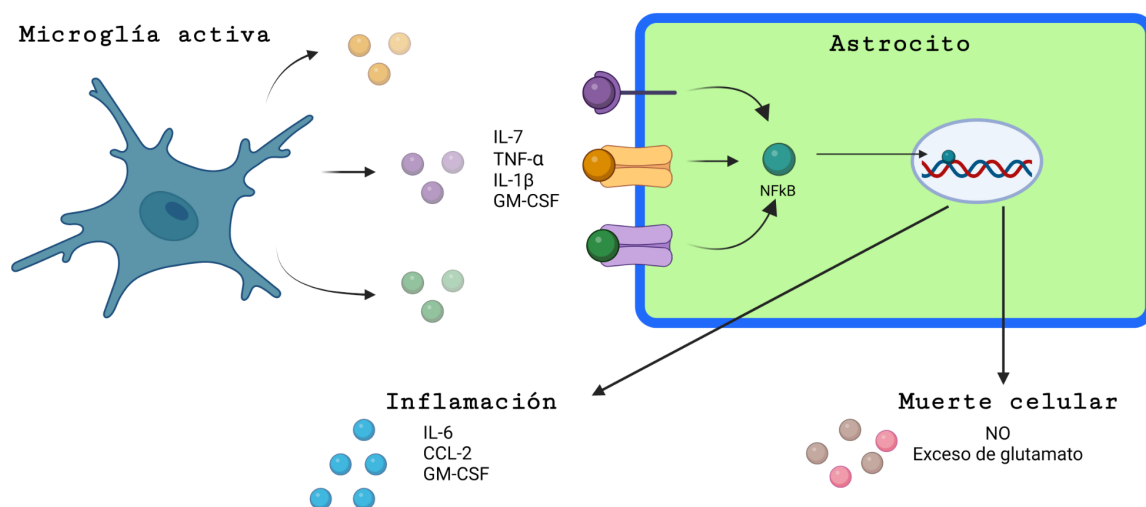


Figura 5. Participación de la microglía y la astrogía en la neuroinflamación. La microglía al ser activada libera una serie de citocinas proinflamatorias, como la interleucina 7 (IL-7), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), las cuales pueden desencadenar una respuesta inflamatoria de los astrocitos, permitiendo la progresión de dicha neuroinflamación, a través de la liberación de interleucina 6 (IL-6), ligando 2 de quimiocina (CCL-2) y GM-CSF, además de contribuir a la muerte neuronal debido una liberación excesiva de glutamato, y una liberación de óxido nítrico (NO).

4.2. Neuroinflamación y epilepsia.

De manera experimental se ha reportado que la actividad convulsiva produce una respuesta inflamatoria en el hipocampo, como lo es la activación de la glía y la producción de citocinas proinflamatorias, asimismo, se ha observado que posterior a la inducción del EE, TNF- α y la IL-6 participan en el progreso de las CER, además de una sobreexpresión de IL-1 β y del receptor tipo 1 de la interleucina 1 (IL-1RI) en la región CA3 del hipocampo (López-Meraz et al., 2016; Webster et al., 2017).

La IL-1 β puede aumentar la muerte neuronal a través de su unión con su receptor (IL-1RI), afectando la actividad de los receptores GABA-A y N-metil-D-aspartato (NMDA) en neuronas hipocampales, lo cual a su vez provoca la amplificación de la excitabilidad neuronal (López-Meraz et al., 2016).

Asimismo, se ha descrito que citocinas proinflamatorias como IL-1 β , interleucina 2 (IL-2) e IL-6, por lo general, se encuentran en bajas cantidades en el cerebro, sin embargo, incrementan posterior a las crisis (Rana & Musto, 2018; Vezzani et al., 2011). La IL-6 es relevante en el proceso neuroinflamatorio, debido a que en conjunto con TNF- α , participa en el aumento de la permeabilidad de BHE, permitiendo la infiltración de leucocitos como los neutrófilos, los cuales contribuyen a la apoptosis de células del tejido (Vezzani et al., 2016). Se ha observado que la IL-1 β , expresada por la activación de astrocitos y la microglía, produce un aumento en la liberación de glutamato, además de disminuir la recaptación de dicho neurotransmisor por los astrocitos, con lo que se aumenta su disponibilidad en las sinapsis, y con ello incrementa la excitabilidad neuronal (Rana & Musto, 2018).

La citocina TNF- α , por lo general, se libera como respuesta a bajos niveles de glutamato, por lo que aumenta la liberación de este neurotransmisor, sin embargo, en

condiciones patológicas contribuye a una alza en la liberación de glutamato desde la microglía, a la vez que genera una alza en la expresión de los receptores NMDA en la neuronas hipocampales, contribuyendo a la neurotoxicidad causada por el incremento en el flujo de calcio que pasa a través de dichos receptores, asimismo, reduce el impulso inhibitorio mediado por GABA debido a la inducción de la recaptura de este neurotransmisor (Rana & Musto, 2018; Vezzani et al., 2016).

5. Levetiracetam.

El levetiracetam (LEV) es un fármaco antiepiléptico de segunda generación indicado como monoterapia o terapia adyuvante en tratamiento de crisis parciales o secundariamente generalizadas de pacientes con ELT (Lyseng-Williamson, K.A., 2011).

El principal mecanismo del LEV es a través de su unión con la proteína de vesículas sinápticas 2A (SV2A) (Al-Shorbagy et al., 2013; Lynch et al., 2004; Surges et al., 2008). La SV2A es una proteína integral de membrana que se encuentra presente en todas las vesículas sinápticas, y de la cual se desconoce su función específica, sin embargo, es claro que se encuentra involucrada en la correcta fusión vesicular, y se ha propuesto que tiene participación en la modulación de la liberación de los neurotransmisores mediada por calcio (Custer, 2006; Janz et al., 1999; Mendoza-Torreblanca et al., 2013).

También, se ha sugerido que el LEV ingresa a las vesículas sinápticas durante el reciclado vesicular y la endocitosis, para posteriormente unirse a la proteína SV2A, con lo que se genera una inhibición en el proceso de fusión vesicular, y, por ende, se ocasiona que haya un menor número de vesículas que liberan su contenido, y a su vez ocurre una disminución en la transmisión sináptica (Meehan et al., 2011, 2012).

Se cree que el principal efecto de LEV es antagonizar el efecto de SV2A, con lo cual se inhibe la participación de esta proteína en las vesículas sinápticas, provocando una disminución en la transmisión sináptica excitadora e inhibitoria, afectando la excitabilidad neuronal (Al-Shorbagy et al., 2013; Surges et al., 2008).

5.1. Efecto antiinflamatorio del levetiracetam

El LEV es un fármaco antiepiléptico que puede presentar una respuesta antiinflamatoria, ya que el tratamiento con este fármaco, ha suprimido la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF- α , IL-1 β 1 o 3 después del EE. Asimismo, un tratamiento continuo con LEV por 30 días, durante la etapa de epileptogénesis, previene la activación microglial (Contreras-García et al., 2022).

Además, se ha observado que, de manera cualitativa, hay una disminución en la gliosis en ratas epilépticas tratadas con LEV, a la vez que reduce la expresión de IL-1 β y del IL-1RI en el hipocampo y la corteza piriforme (Kim, J. E. et al., 2010).

Sin embargo, pese al efecto antiinflamatorio del LEV que ha sido reportado durante el EE, aún sigue siendo una incógnita la relación que puede existir entre dicho efecto y las células de la glía, de manera específica, entre el número de células de la microglía y la astrogliá durante la epilepsia crónica, ya que éstas tienen participación durante la generación de la respuesta inflamatoria en regiones cerebrales que presentan condiciones patológicas.

Por lo que, resulta importante estudiar el efecto del levetiracetam sobre la glía en el hipocampo de ratas con epilepsia del lóbulo temporal a través de la evaluación del número de astrocitos y microglía, con los marcadores GFAP e Iba-1 respectivamente.

Planteamiento del problema

La epilepsia es una enfermedad neurológica crónica que se encuentra caracterizada por un aumento en la excitabilidad neuronal, que genera daño cerebral, produciendo así mecanismos de neuroinflamación. El LEV es un FAE de segunda generación que es efectivo en el control de las crisis, y que ha demostrado tener un efecto sobre la hiperexcitabilidad que se produce durante la epilepsia, sin embargo, el efecto que presenta este fármaco sobre la astrogliá y microglía sigue en estudio, por lo que el objetivo de este proyecto es evaluar el efecto que tiene el LEV sobre la astrogliá y microglía en el hipocampo de ratas con epilepsia del lóbulo temporal.

Justificación

La epilepsia es una enfermedad crónica que afecta a más de 65 millones de personas alrededor del mundo, sin importar la edad. La epilepsia focal más frecuente es la ELT, la cual puede producir neurodegeneración del hipocampo y es la epilepsia farmacorresistente más común, ya que hasta en un 30% de los pacientes con ELT no se puede controlar sus convulsiones con un tratamiento médico. Debido a que es una enfermedad de alta incidencia, se han desarrollado FAEs con el objetivo de poder controlar las crisis, así como disminuir las comorbilidades. El LEV es un FAE de segunda generación que es altamente efectivo para el control de las crisis y que se ha visto que tiene efectos sobre la hiperexcitabilidad neuronal, sin embargo, poco se conoce del efecto que tiene el LEV sobre la glía, por lo que el presente proyecto permitirá mejorar la comprensión del mecanismo por el cual el LEV participa en la disminución de las crisis convulsivas a través de su efecto sobre la glía.

Objetivos

General:

- Determinar el efecto del LEV sobre el número de células de la astrogliá y microglía en el hipocampo de ratas con ELT.

Específicos:

- Cuantificar el número de astrocitos en el hipocampo de ratas control, control tratadas con LEV, epilépticas y epilépticas tratadas con LEV
- Cuantificar el número de microglía en el hipocampo de ratas control, control tratadas con LEV, epilépticas y epilépticas tratadas con LEV

Hipótesis

Durante la epilepsia ocurren cambios a niveles fisiológicos, tales como la respuesta neuroinflamatoria, causada por el daño neuronal y la activación de la glía, lo cual a su vez contribuye a la hiperexcitabilidad y muerte neuronal. El LEV ha presentado un

efecto antiinflamatorio, por lo que su administración disminuirá el aumento de células gliales en el hipocampo de ratas con epilepsia del lóbulo temporal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

Para la realización de este proyecto se tomaron en cuenta 4 grupos experimentales: control (CTRL), control tratado con LEV (CTRL+LEV), epiléptico (EPI) y epiléptico tratado con LEV (EPI+LEV). En primer lugar, a los grupos EPI y EPI+LEV se les indujo el estado epiléptico (EE), manteniendo dicho estado durante 90 minutos, y posterior a la inducción del EE, se les dieron cuidados especiales durante 3 días. Las ratas que presentaron al menos tres CER en una semana, fueron incluidas en el grupo EPI o EPI+LEV.

Para el tratamiento de los grupos EPI+LEV y CTRL+LEV, se les implantó una bomba osmótica, la cual permitió la administración del fármaco de una manera continua durante los siete días de tratamiento. Una vez concluido el tratamiento con LEV, las ratas fueron sometidas a eutanasia para la obtención de cerebro. Con las muestras de tejido, se realizaron las inmunohistoquímicas para los marcadores proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (Iba-1), de los cuatro grupos experimentales (CTRL, CTRL+LEV, EPI y EPI+LEV).

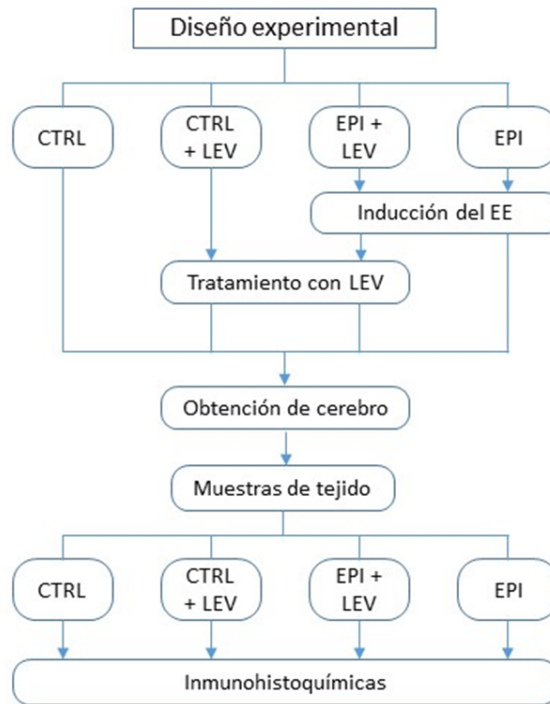


Figura 6. Diseño experimental. Diseño experimental del proyecto, el cual involucró cuatro grupos experimentales (CTRL, CTRL+LEV, EPI y EPI+LEV). En primer lugar, se indujo estado epiléptico (EE) a las ratas de los grupos EPI y EPI+LEV, después, a los grupos CTRL+LEV y EPI+LEV se les trató con levetiracetam, para que finalmente fueran sacrificadas para la obtención de cerebro. Posteriormente, se realizaron las inmunohistoquímicas para los marcadores GFAP (astrocitos) e Iba-1 (microglía).

Población, criterios de inclusión, exclusión y eliminación

La población de este estudio fueron ratas de la cepa Wistar, adquiridas del Instituto de Investigaciones Biomédicas, que se mantuvieron al cuidado y manejo de acuerdo con la norma oficial mexicana de la secretaría de agricultura (SAGARPA NOM-062-Z00-1999) publicada en 2001: “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”, asimismo, siguiendo los lineamientos internos del Reglamento del Bioterio del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

Se utilizaron ratas con un peso de entre 250 y 300 g al inicio del experimento, que presentaron el EE en un máximo de dos horas, así como un estadio de tres o más en la escala de Racine (Anexo 1), una vez que entraron en EE; además de presentar tres CER por semana. Fueron excluidas las ratas que presentaron un deterioro

general en su estado de salud posterior al EE, asimismo, las que presentaron un continuo deterioro, alguna enfermedad o muerte.

Inducción del estado epiléptico

La inducción del EE se realizó a través de la administración de litio y pilocarpina, la cual genera una lesión inicial en los animales. Se definió a la actividad convulsiva continua que ocurre por más de 30 minutos como EE (Wylie et al., 2022). Los grupos EPI y EPI+LEV fueron pretratados con cloruro de litio (127 mg/kg; vía i.p.) entre 19 y 24 horas antes de que fuera administrada la pilocarpina. El día de la inducción del EE, las ratas fueron administradas con bromuro de metilescopolamina (1 mg/kg; vía i.p.) 30 minutos antes de recibir la dosis de pilocarpina (60 mg/kg; vía i.p.). Cuando el EE no se presentó en los primeros 60 minutos, se administró una segunda dosis de pilocarpina, sin embargo, si el EE no se presentó, el animal fue excluido del estudio.

La conducta convulsiva se observó y se clasificó de acuerdo con la escala de Racine (anexo 1). Cuando la rata alcanzó la puntuación de 3 a 5 y se mantuvieron las crisis convulsivas, se estableció la hora de inicio del EE; los animales se mantuvieron en este estado durante 90 minutos, al finalizar este lapso, el EE se detuvo con la administración de diazepam (5 mg/kg; vía i.m.), y se colocó a los animales en una cama de hielo por aproximadamente 60 minutos, con la finalidad de disminuir la hipertermia generada durante y después del EE. Ocho horas después de la administración de la primera dosis de diazepam, se administró una segunda dosis.

Tratamiento con levetiracetam e implantación de las minibombas

El LEV se administró a través de bombas osmóticas (Alzet®), las cuales mantuvieron una liberación continua de LEV (300 mg/Kg/día) durante la semana de tratamiento. Las bombas fueron llenadas a partir de 2 tabletas de LEV (500 mg), marca Keppra, disueltas en 3 ml solución salina (NaCl 0.9%). Dicha mezcla se centrifugó durante 15 minutos, el sobrenadante se decantó y se filtró para rellenar las bombas, las cuales una vez llenas, fueron incubadas por aproximadamente 4 horas a 37°C en solución salina (NaCl 0.9%), con lo que se aseguró la inmediata liberación del contenido después del implante de la bomba. Al finalizar este tiempo, las bombas se implantaron de manera subcutánea, para ello, los animales se anestesiaron con isoflurano al 5%

(con flujo de O₂ de 2 mL/min) para la inducción anestésica, y del 2-3% para el mantenimiento del efecto. Una vez confirmada la anestesia, a través de la ausencia del reflejo flexor, se realizó una incisión en la espalda del animal a la altura de la escápula izquierda, creando una bolsa bajo la piel, en la cual se colocó la bomba osmótica. La incisión realizada fue suturada y limpiada con solución antiséptica, para después administrar una dosis

Obtención de muestras del tejido

Para la obtención de tejido para inmunohistoquímicas, los animales se anestesiaron vía i.p. con pentobarbital (120-210 mg/kg). Una vez anestesiados, fueron perfundidos de manera intracardiaca con solución salina (NaCl 0.9%), seguida de paraformaldehído (4%, diluido en buffer de fosfatos (PB) 0.1M, pH 7.4).

Después de la perfusión, los animales fueron decapitados con una guillotina afilada, sus cerebros fueron disecados y post fijados a temperatura ambiente aproximadamente por 24 horas en paraformaldehído. Terminado dicho plazo, los cerebros fueron transferidos a una solución de sacarosa (20% y 30%) hasta tener una completa infiltración. Después, los cerebros fueron congelados en 2-metilbutano, y almacenados hasta su uso (-80°C). Finalmente, se realizaron cortes sagitales seriados del cerebro (40 µm) con el uso de un criostato de la marca Crycut, modelo 1800; el tejido se almacenó a -20°C en solución crioprotectora.

Inmunohistoquímicas

Para evaluar la expresión glial se realizaron inmunohistoquímicas para detectar los marcadores GFAP (astrocitos) e Iba-1 (microglía). Se colocaron de 3 a 4 cortes por pozo en cajas de cultivo de 24 pozos. En el primer día, los cortes fueron lavados durante 10 minutos con PB con Tritón (PBT; 0.1M; pH 7.4; tritón X-100, 0.3%) 3 veces, con la finalidad de permeabilizar los tejidos, posterior a estos lavados, se procedió a inactivar la peroxidasa endógena durante 10 minutos, agregando peróxido de hidrógeno al 3%, y se volvieron a realizar 3 lavados con PBT, durante 10 minutos cada uno. Después de los segundos lavados, se agregó solución de bloqueo (Suero Fetal Bovino al 5%), y se dejó actuar durante 1 hora, para posteriormente agregar el anticuerpo primario disuelto en solución de bloqueo en una concentración 1:500

(GFAP; ratón IgG, Santa Cruz, sc-33673) o 1:400 (Iba-1; cabra IHC-P, ab5076), dejándolo por toda la noche.

Al día siguiente, se inició con 3 lavados de PBT, de 15 minutos cada uno, finalizados los lavados, se agregó la disolución del anticuerpo secundario anti-ratón (1:500, Vector, BA-2000) y anti-cabra (1:500, Vector, BA-9500) con solución de bloqueo, y se dejó actuar durante 2 horas. Una vez pasadas las 2 horas, se realizaron 3 lavados con PB, de 10 minutos cada uno, para posteriormente agregar Avidina-Biotina preparada con PBT, dejándolo actuar durante 1 hora. Transcurrida la hora, se realizaron 3 lavados con PB, de 10 minutos cada uno y finalmente se realizó el revelado con 3,3'-diaminobencidina (DAB, Vector, SK-4100).

Montaje de las muestras

Para montar las muestras, se utilizaron portaobjetos gelatinizados, en los cuales se colocaron los tejidos, dejándolos secar antes de ser deshidratados. Los tejidos, una vez secos, se sumergieron durante 5 minutos, de manera ascendente, en las concentraciones de alcohol (50%, 70%, 95% y 100%) y finalmente en el xilol. Una vez terminado el tiempo de los tejidos en el xilol, estos se montaron con resina (cytoseal) para su posterior visualización en el microscopio.

Cuantificación celular

El conteo de células Iba-1 y GFAP inmunopositivas se realizó en 5 capas del hipocampo, diferentes para cada marcador, dependiendo de la marca observada. Para el conteo de células GFAP+, se tomaron en cuenta el hilus y la capa molecular del giro dentado, asimismo, el *stratum radiatum* de CA1 y CA3, y el *stratum lacunosum moleculare* de CA1. En el caso de la cuantificación de células inmunopositivas a Iba-1, se tomaron en cuenta la capa molecular del giro dentado, la capa piramidal y el *stratum radiatum* tanto de CA1 como de CA3.

Para la cuantificación celular se utilizó el software ImageJ. Se trabajó con fotografías a 4x para cada corte, a las cuales, con la herramienta Polígono se les delimitaron las capas del hipocampo a analizar y se agregaron al ROI manager, seleccionado de la pestaña Analyze, opción Tools y finalmente ROI manager. Una vez delimitadas todas las capas requeridas, la imagen se convirtió a 8 bits, a través de la pestaña Image,

seleccionando Type y finalmente 8-bits. Con la herramienta Straight se realizó una línea sobre una célula inmunopositiva al marcador, se seleccionó de la pestaña Analyze la opción Set scale para obtener el tamaño de la célula en píxeles.

Posteriormente de la pestaña Process, se seleccionó la opción Subtract background, se colocaron los píxeles obtenidos previamente de Set scale en la opción Rolling ball radius y se seleccionó OK. Después, de la pestaña Image, se seleccionó la opción Adjust, y a su vez Threshold, donde se ajustaron los valores para tener los cuerpos celulares rellenos, y se seleccionó Apply.

De la pestaña Process se seleccionó la opción Binary, y a su vez Fill holes, de la misma opción, Binary, se seleccionó Convert to mask y Watershed. Finalmente, de la pestaña Analyze se seleccionó la opción Analyze particles, dentro de la pestaña desplegada, en Size se dejaron los valores por defecto, al igual que en Circulatory, en Show se seleccionó la opción Outlines, asimismo, se seleccionaron las opciones Display results, Clear results, Summarize, Exclude on edge e Include holes, terminando el análisis seleccionando OK. Se guardó el resumen de cada corte para el posterior análisis de datos.

Pruebas estadísticas realizadas

Para los análisis estadísticos, se realizó una prueba de ANOVA de una vía considerando un valor de $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativo; asimismo, para la comparación de los grupos se utilizó la prueba post hoc de Tukey-Kramer. Finalmente, para la representación gráfica se tomaron en cuenta la media y la desviación estándar de cada grupo.

RESULTADOS

Inmunotinción para GFAP

De manera cualitativa, en el hilus del giro dentado (Figura 7, capa delineada en rojo), se observa un aumento en células *GFAP*⁺ en el grupo EPI con respecto a los demás grupos, dicho aumento se ve reducido en el grupo EPI+LEV, asimismo, se observa una disminución en el grupo CTRL+LEV, respecto al grupo CTRL. En la capa molecular del giro dentado (Figura 7, capa delineada en azul) se observa una

disminución de células *GFAP*⁺ en el grupo CTRL+LEV, respecto al grupo CTRL (Figura 7).

Por otro lado, se puede observar que en el grupo EPI hay un aumento de células *GFAP*⁺ en el *stratum radiatum* de CA1 (Figura 7, capa delineada en verde), respecto a los demás grupos, asimismo, se puede observar que en el grupo EPI+LEV hay una disminución de células *GFAP*⁺ en dicha región, respecto al grupo EPI. Además, se observa una disminución de marcaje en el grupo CTRL+LEV, respecto al grupo CTRL (Figura 7).

En el caso del *stratum radiatum* de CA3 (Figura 7, capa delineada en amarillo), hay un mayor marcaje en el grupo EPI, respecto a los demás grupos, asimismo, se observa un menor marcaje en los grupos EPI+LEV y CTRL+LEV, comparados con el grupo EPI y CTRL, respectivamente. Finalmente, en el *stratum lacunosum moleculare* de CA1 (Figura 7, capa delineada en morado) se observa una disminución en células *GFAP*⁺ del grupo CTRL+LEV, respecto al grupo CTRL, asimismo, una ligera disminución en el EPI+LEV, comparado con el grupo EPI (Figura 7).

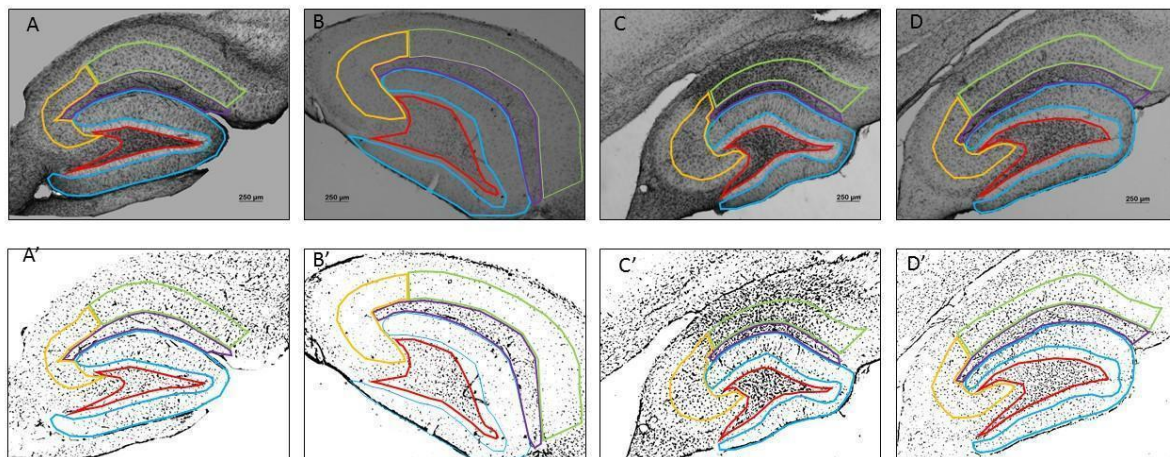


Figura 7. Cortes sagitales de hipocampo de rata que muestran las inmunohistoquímicas de GFAP. Células inmunopositivas a GFAP, A) Grupo control, B) Grupo control tratado con levetiracetam, C) Grupo epiléptico y D) Grupo epiléptico tratado con levetiracetam. A') Grupo control analizado con ImageJ, B') Grupo control tratado con levetiracetam analizado con ImageJ, C') Grupo epiléptico analizado con ImageJ y D') Grupo epiléptico tratado con levetiracetam analizado con ImageJ. Rojo: Hilus del giro dentado. Azul: Capa molecular del giro dentado. Verde: *Stratum radiatum* CA1. Amarillo: *Stratum radiatum* CA3. Morado: *Stratum lacunosum moleculare*.

De manera cuantitativa, en el hilus del giro dentado, el grupo EPI (491.7333 ± 126.1495) presentó un aumento con respecto a los grupos CTRL+LEV ($241.875 \pm$

75.6891) y EPI+LEV (313.1726 ± 56.53774), sin embargo, el aumento observado con respecto al grupo CTRL (361.9167 ± 60.49372) no fue significativo. Con los análisis tanto cualitativo como cuantitativo, se observa que en esta capa del giro dentado hubo un ligero aumento en células *GFAP*⁺ en el grupo EPI, asimismo el LEV disminuyó el número de células *GFAP*⁺ (Figura 8).

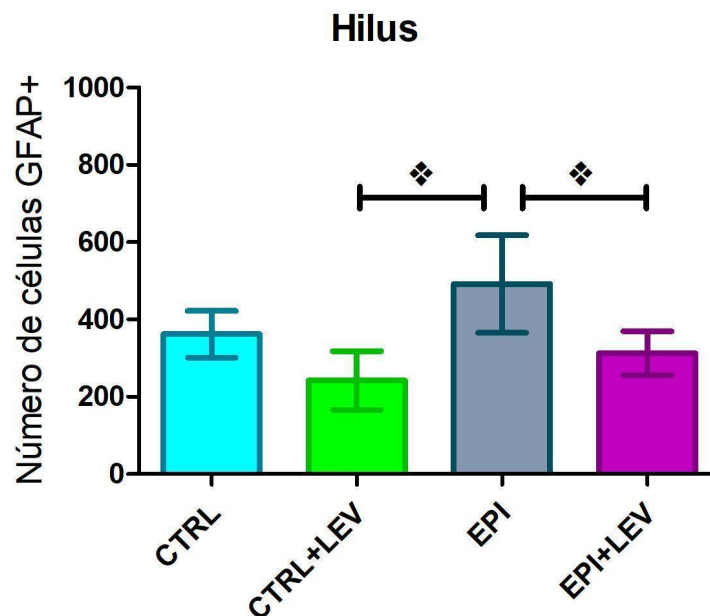


Figura 8. Cuantificación de los astrocitos localizados en el hilus del giro dentado del hipocampo de ratas de los grupos control (CTRL), control tratado con LEV (CTRL+LEV), epiléptico (EPI) y epiléptico tratado con LEV (EPI+LEV). La gráfica muestra el número de células inmunopositivas a GFAP. Media ± D.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba *post hoc* de Tukey-Kramer. * $p \leq 0.05$.

En la capa molecular del giro dentado, el grupo EPI (758.6667 ± 157.057) presentó un aumento en células *GFAP*⁺ respecto a los grupos CTRL (416.4583 ± 94.69086), CTRL+LEV (232.125 ± 84.15081) y EPI+LEV (459.6548 ± 133.9137). Indicando así, que en las ratas epilépticas hubo un aumento en células *GFAP*⁺, asimismo, el LEV restauró el número de células *GFAP*⁺ en ratas epilépticas. Además de que el LEV disminuyó, no significativamente, la cantidad de células *GFAP*⁺ en el grupo CTRL+LEV, respecto al CTRL (Figura 9).

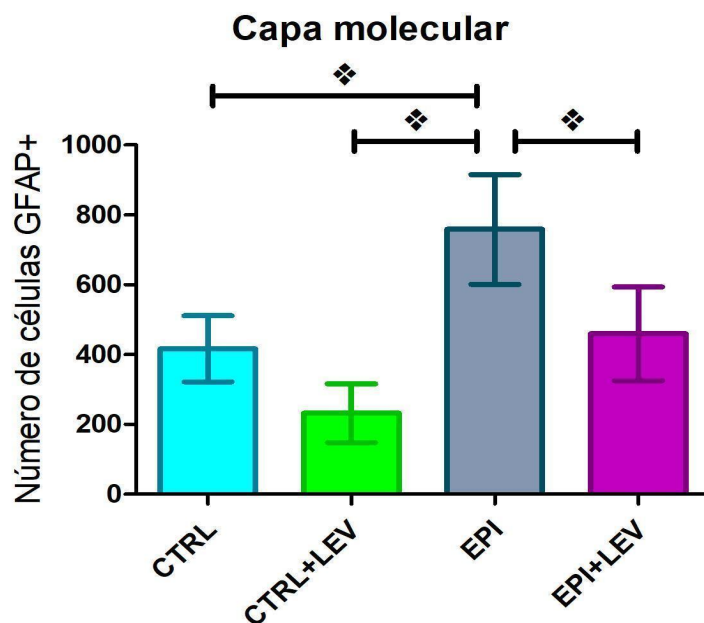


Figura 9. Cuantificación de los astrocitos localizados en la capa molecular del giro dentado del hipocampo de ratas de los grupos control (CTRL), control tratado con LEV (CTRL+LEV), epiléptico (EPI) y epiléptico tratado con LEV (EPI+LEV). La gráfica muestra el número de células inmunopositivas a GFAP. Media \pm D.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba *post hoc* de Tukey-Kramer. * $p \leq 0.05$.

En el caso del *stratum radiatum* de CA1, el grupo EPI (378.2333 ± 90.11186) presentó un aumento en células *GFAP*⁺ respecto a los grupos CTRL (225.3333 ± 36.85884) y CTRL+LEV (113.5 ± 56.84335), asimismo, el grupo EPI+LEV (317.9167 ± 93.06176) presentó un mayor número de células *GFAP*⁺ respecto al grupo CTRL+LEV (Figura 10).

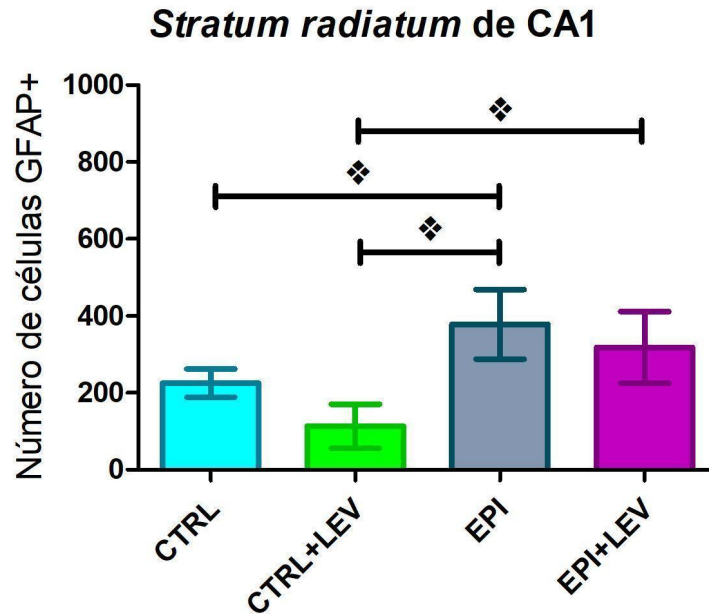


Figura 10. Cuantificación de los astrocitos localizados en *stratum radiatum* de CA1 del hipocampo de ratas de los grupos control (CTRL), control tratado con LEV (CTRL+LEV), epiléptico (EPI) y epiléptico tratado con LEV (EPI+LEV). La gráfica muestra el número de células inmunopositivas a GFAP. Media \pm D.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba *post hoc* de Tukey-Kramer. * $p \leq 0.05$.

En el *stratum radiatum* de CA3, el grupo EPI (525.6 ± 76.50005) presentó un mayor número de de células *GFAP*⁺ respecto a los demás grupos; CTRL (282.9167 ± 54.20221), CTRL+LEV (183.0833 ± 20.75452) y EPI+LEV (304.131 ± 58.33261), asimismo, el grupo EPI+LEV presentó un mayor número de células *GFAP*⁺ respecto al CTRL+LEV. Los resultados indican que, en esta capa del hipocampo, hay un aumento de células *GFAP*⁺ en las ratas epilépticas, y hay una disminución en el marcaje en el grupo EPI+LEV, respecto al EPI, indicando que el LEV revirtió dicho aumento de células *GFAP*⁺ en las ratas epilépticas (Figura 11).

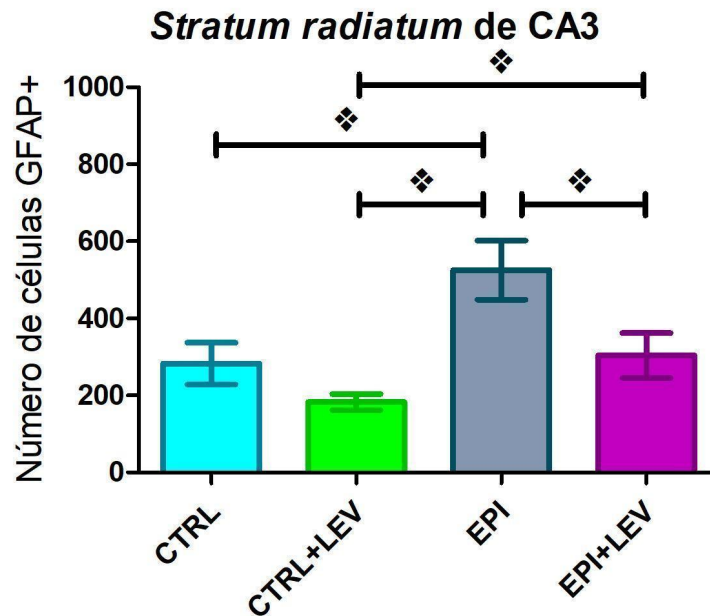


Figura 11. Cuantificación de los astrocitos localizados en *stratum radiatum* de CA3 del hipocampo de ratas de los grupos control (CTRL), control tratado con LEV (CTRL+LEV), epiléptico (EPI) y epiléptico tratado con LEV (EPI+LEV). La gráfica muestra el número de células inmunopositivas a GFAP. Media \pm D.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba *post hoc* de Tukey-Kramer. * $p \leq 0.05$.

Finalmente, para el *stratum lacunosum moleculare* de CA1, el grupo EPI (380.8667 ± 62.75375) presentó un mayor número de células *GFAP*⁺ respecto al grupo CTRL+LEV (230.625 ± 92.53091), sin embargo, no presentó un aumento significativo respecto a los demás grupos, CTRL (332.9167 ± 29.13204) y EPI+LEV (303.6488 ± 57.58142); indicando que el LEV no tiene un efecto sobre la cantidad de células *GFAP*⁺ en esta capa del hipocampo (Figura 12).

Stratum lacunosum moleculare de CA1

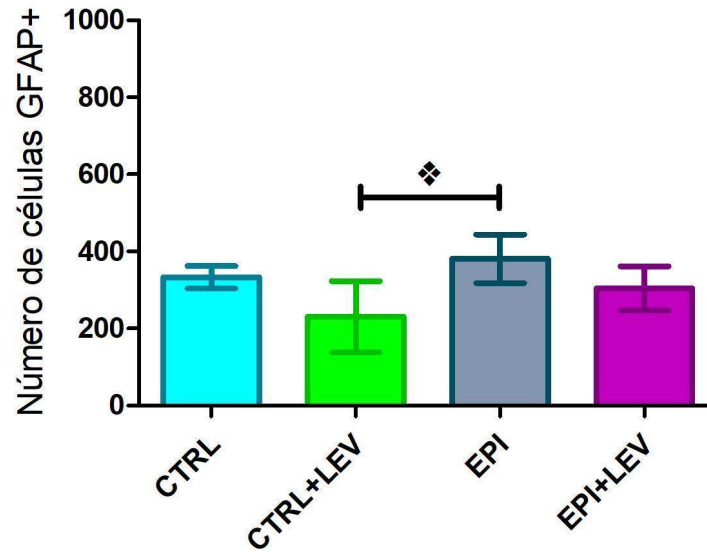


Figura 12. Cuantificación de los astrocitos localizados en *stratum lacunosum moleculare* de CA1 del hipocampo de ratas de los grupos control (CTRL), control tratado con LEV (CTRL+LEV), epiléptico (EPI) y epiléptico tratado con LEV (EPI+LEV). La gráfica muestra el número de células inmunopositivas a GFAP. Media \pm D.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba *post hoc* de Tukey-Kramer. * $p \leq 0.05$.

Inmunotinción para Iba-1

En las inmunohistoquímicas de Iba-1, de manera cualitativa, no se observaron diferencias en la mayoría de las capas analizadas (Figura 13), sin embargo, en la capa piramidal de CA1 (Figura 13, capa delineada en verde) del grupo EPI, se observó un mayor marcaje con respecto a los demás grupos (Figura 13).

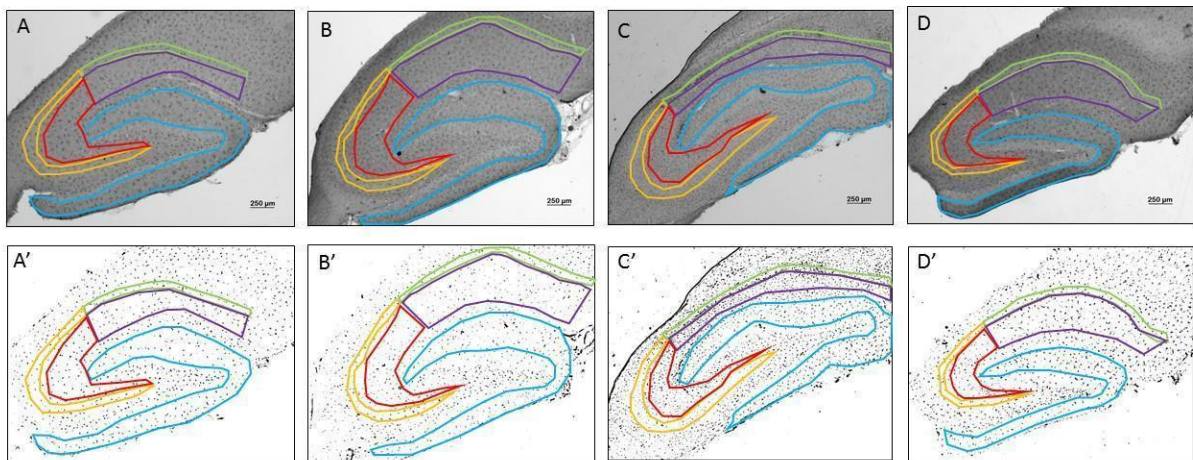


Figura 13. Cortes sagitales de hipocampo de rata que muestran las inmunohistoquímicas de Iba-1. Células inmunopositivas a Iba-1, A) Grupo control, B) Grupo control tratado con levetiracetam,

C) Grupo epiléptico y D) Grupo epiléptico tratado con levetiracetam. A') Grupo control analizado con ImageJ, B') Grupo control tratado con levetiracetam analizado con ImageJ, C') Grupo epiléptico analizado con ImageJ y D') Grupo epiléptico tratado con levetiracetam analizado con ImageJ. Azul: Capa molecular del giro dentado. Verde: Capa piramidal de CA1. Amarillo: Capa piramidal de CA3. Morado: *Stratum radiatum* CA1. Rojo: *Stratum radiatum* CA3.

De manera cuantitativa, en la capa molecular del giro dentado, los grupos CTRL (279.6555 ± 31.54239), CTRL+LEV (342.5625 ± 139.1818), EPI (340.5 ± 147.7217) y EPI+LEV (399.0417 ± 211.7338) no presentaron un aumento significativo en la cantidad de células Iba-1+ entre sí, sin embargo, se observa un ligero aumento en los grupos tratados con LEV, respecto a los no tratados (Figura 14).

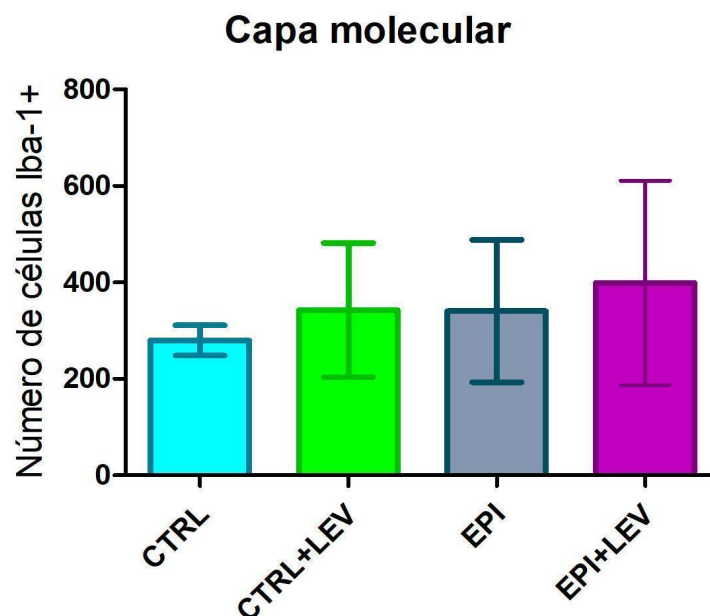


Figura 14. Cuantificación de la microglía localizada en la capa molecular del giro dentado del hipocampo de ratas de los grupos control (CTRL), control tratado con LEV (CTRL+LEV), epiléptico (EPI) y epiléptico tratado con LEV (EPI+LEV). La gráfica muestra el número de células inmunopositivas a Iba-1. Media ± D.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba *post hoc* de Tukey-Kramer. * $p \leq 0.05$.

En la capa piramidal de CA1, los grupos CTRL (22.83333 ± 5.033223), CTRL+LEV (36.78333 ± 13.51675), EPI (104.6667 ± 69.96914) y EPI+LEV (53.80833 ± 69.96914) no mostraron un aumento significativo entre sí, sin embargo, en el grupo EPI hubo un aumento, no significativo, respecto a los demás grupos (Figura 15). Tampoco en el caso del *Stratum radiatum* de CA1, los grupos CTRL (152.6555 ± 16.94076), CTRL+LEV (178.3542 ± 65.56578), EPI (164.6333 ± 110.6946) y

EPI+LEV (186.6917 ± 87.09723) mostraron diferencias significativas, entre los grupos, de las células Iba-1+ (Figura 16).

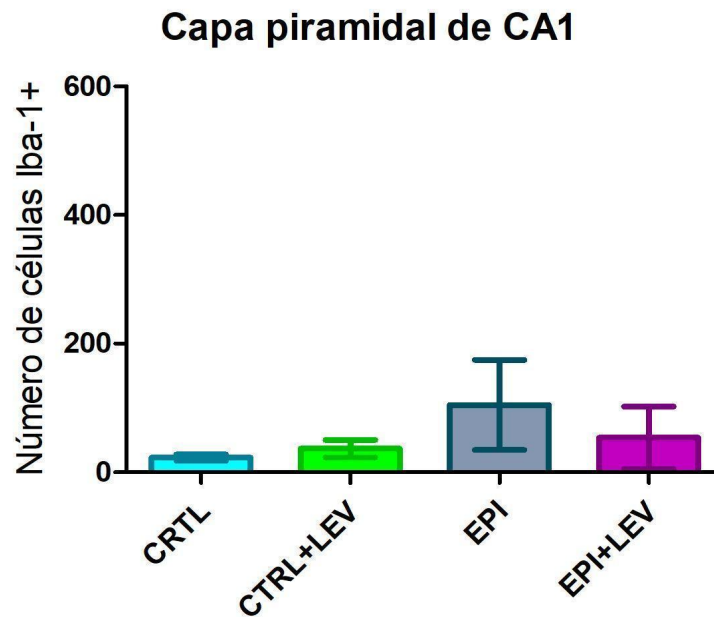


Figura 15. Cuantificación de la microglía localizada en la capa piramidal de CA1 del hipocampo de ratas de los grupos control (CTRL), control tratado con LEV (CTRL+LEV), epiléptico (EPI) y epiléptico tratado con LEV (EPI+LEV). La gráfica muestra el número de células inmunopositivas a Iba-1. Media \pm D.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba *post hoc* de Tukey-Kramer. * $p \leq 0.05$.

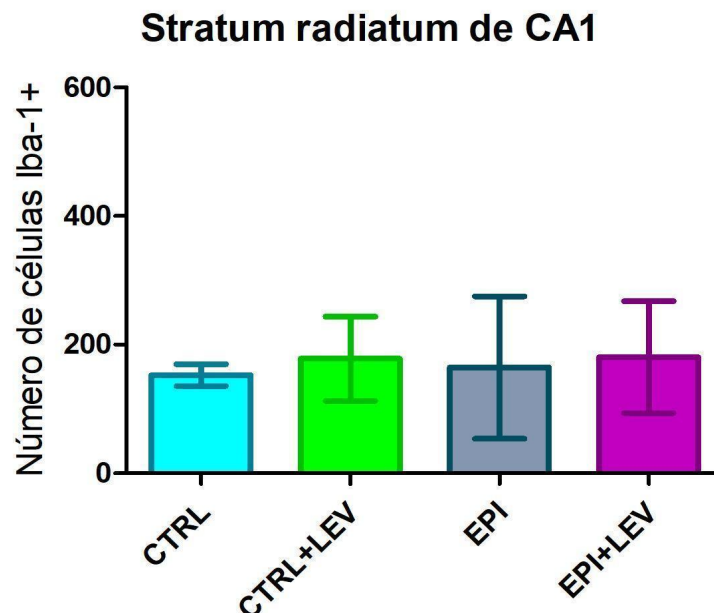


Figura 16. Cuantificación de la microglía localizada en *stratum radiatum* de CA1 del hipocampo de ratas de los grupos control (CTRL), control tratado con LEV (CTRL+LEV), epiléptico (EPI) y

epiléptico tratado con LEV (EPI+LEV). La gráfica muestra el número de células inmunopositivas a Iba-1. Media \pm D.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba *post hoc* de Tukey-Kramer. * $p \leq 0.05$.

Por otro lado, en la región CA3 del hipocampo, tanto en la capa piramidal, los grupos CTRL (41.07778 \pm 9.722044), CTRL+LEV (76.17083 \pm 20.2976), EPI (90 \pm 33.56606) y EPI+LEV (78.14167 \pm 32.88384) (Figura 17), como en *stratum radiatum* los grupos CTRL (199.4222 \pm 40.40677), CTRL+LEV (256.0292 \pm 53.28225), EPI (155.4 \pm 91.51022) y EPI+LEV (214.4 \pm 120.0964) no mostraron un aumento significativo de las células Iba-1+ (Figura 18).

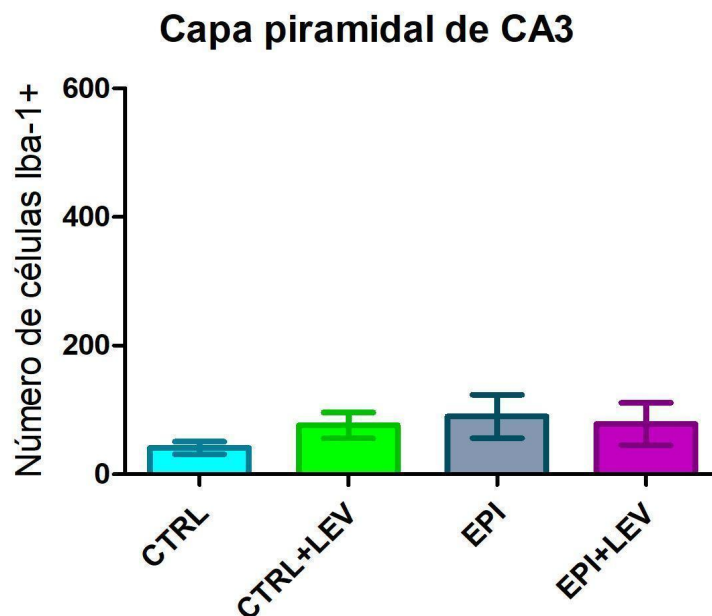


Figura 17. Cuantificación de la microglía localizada en la capa piramidal de CA3 del hipocampo de ratas de los grupos control (CTRL), control tratado con LEV (CTRL+LEV), epiléptico (EPI) y epiléptico tratado con LEV (EPI+LEV). La gráfica muestra el número de células inmunopositivas alba-1. Media \pm D.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba *post hoc* de Tukey-Kramer. * $p \leq 0.05$.

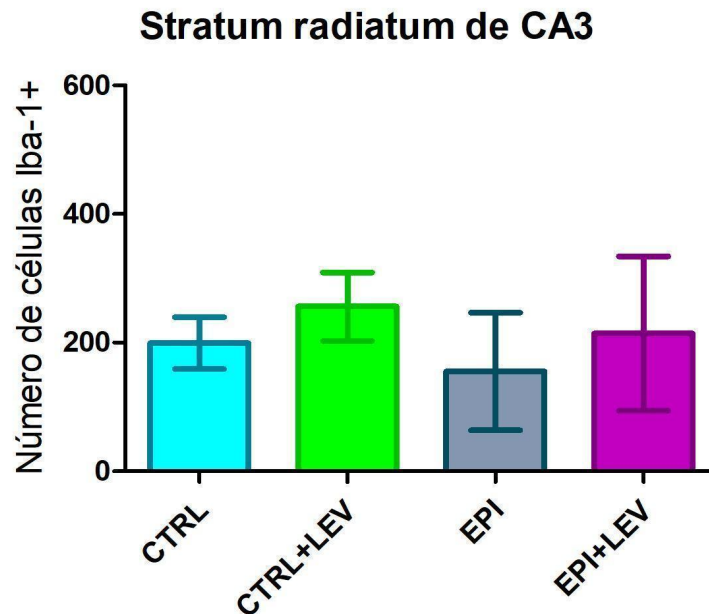


Figura 18. Cuantificación de la microglía localizada en *stratum radiatum* de CA3 del hipocampo de ratas de los grupos control (CTRL), control tratado con LEV (CTRL+LEV), epiléptico (EPI) y epiléptico tratado con LEV (EPI+LEV). La gráfica muestra el número de células inmunopositivas a Iba-1. Media \pm D.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba *post hoc* de Tukey-Kramer. * $p \leq 0.05$.

DISCUSIÓN

En este trabajo de investigación, el grupo de ratas epilépticas presentó un aumento en el número de células GFAP+ en el hilus y capa molecular del giro dentado, así como en *stratum radiatum* de CA1 y CA3 del hipocampo, con respecto al grupo control, siendo mayormente notable en la región CA1. Los resultados indican que, en el hipocampo, durante la fase crónica de la epilepsia, hay un aumento en la cantidad de células astrogliales, las cuales podrían encontrarse participando en la progresión de la neuroinflamación, debido a que se ha reportado que estas células liberan citocinas proinflamatorias como la IL-1 β e IL-6, así como NO, induciendo con ello, procesos apoptóticos, que se verían reflejados en la muerte neuronal reportada en estas capas (López-Meraz et al., 2016; Rana & Musto, 2018; Webster et al., 2017).

Por otro lado, se ha reportado que los transportadores de glutamato, presentes en la astroglia, sufren de una alteración, con la cual ocurre una deficiencia en la recaptura de dicho neurotransmisor, lo que a su vez produce un exceso de glutamato disponible en el espacio sináptico (Jessen, 2004). Asimismo, han sido reportados cambios en la concentración de potasio extracelular, que participa en la alteración del balance

glutamatérgico, a través de impedir la recaptura de glutamato por los astrocitos, con lo que se produciría un aumento en la excitabilidad neuronal, neuroinflamación, y por ende, una muerte celular progresiva (Wang et al., 2020).

Asimismo, los resultados reportados en este trabajo, muestran que en las ratas epilépticas tratadas con LEV hay una menor cantidad de células GFAP+, respecto al grupo epiléptico, sugiriendo que el LEV revierte la astrogliosis que ocurre en el hipocampo durante la fase crónica de la epilepsia. De manera previa, se ha reportado una disminución en la expresión de IL-1 β e IL-1RI, lo que se ha asociado con una disminución de células gliales, indicando así, que el LEV disminuye los astrocitos reactivos, y con ello podría contribuir a un balance entre el sistema excitador e inhibitor, a través de una mejora en la recaptura de glutamato, impidiendo que exista una incrementada excitabilidad neuronal (Kim et al., 2010).

El aumento de células GFAP+ que fue observado en capas cercanas a las células piramidales del hipocampo, podría relacionarse con la muerte neuronal que ocurre en estas capas. Por lo que el LEV, al disminuir la astrogliosis del hipocampo, podría evitar parcialmente la muerte neuronal en las capas anteriormente mencionadas, a la vez que participaría en la reducción de la hiperexcitabilidad, debido a que se produciría una disminución en la liberación de citocinas proinflamatorias, con lo que se daría una menor desregulación de las redes neuronales, así como una mayor regulación de neurotransmisores disponibles en el espacio sináptico (Kim et al., 2010).

Los resultados de este trabajo de investigación, de manera cuantitativa, corroboran lo reportado por Kim (2009), el cual con un modelo de ELT inducida con pilocarpina en ratas, observó, de manera cualitativa, un aumento de células GFAP+ en ratas epilépticas, respecto a las controles, asimismo, observó una disminución de células GFAP+ en ratas epilépticas tratadas con LEV (30 mg/kg) durante una semana, respecto a las epilépticas, con lo que los autores sugieren que el LEV tiene su efecto antiinflamatorio debido a una regulación en las funciones de la astrogliá, es decir, permitiendo la recaptura de glutamato, y con ello disminuyendo la disponibilidad de dicho neurotransmisor en el espacio sináptico.

Por otro lado, en este estudio, en el marcaje de la microglía con Iba-1, no se presentaron diferencias significativas en la cantidad de células Iba-1+ entre los diferentes grupos, sugiriendo que, durante la fase crónica de la epilepsia, no hay una diferencia en las células Iba-1+, respecto a los controles. Asimismo, se ha reportado que en un modelo de ratones post-EE con pilocarpina, tampoco se observaron diferencias en la cantidad de células Iba-1+ entre los diferentes grupos (Itoh et al., 2019).

De acuerdo a Itoh (2019) el LEV no tuvo un efecto sobre la cantidad de células Iba-1+ en ratones post-EE tratados con LEV (360 mg/kg), respecto a los post-EE, similar a lo observado en este trabajo. Sin embargo, los mismos autores reportaron una disminución en la cantidad de células microgliales activadas en ratones post-EE tratados con LEV, respecto a los post-EE, lo que indicaría que el LEV podría presentar algún efecto sobre la activación de la microglía durante la fase crónica de la epilepsia, con lo que se reduciría la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias, así como de la alteración en las redes neuronales y la muerte neuronal.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se puede concluir que el levetiracetam revirtió el aumento de astrocitos de las ratas con epilepsia crónica, lo que sugiere que uno de los efectos antiinflamatorios de este fármaco podría ser a través de dichas células.

Por otro lado, el levetiracetam no tuvo efectos significativos sobre la cantidad de células de la microglía. Sin embargo, el efecto antiinflamatorio del LEV podría estar relacionado con la activación de la microglía, más que con la modulación de la cantidad de estas células.

Por lo anterior, realizar un análisis de todas las capas del hipocampo, explorar el efecto del LEV sobre la activación microglial y cuantificar las citocinas, liberadas por la astrogliá y la microglía, proporcionaría una mayor perspectiva del efecto antiinflamatorio del LEV en la epilepsia crónica.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Shorbagy, M. Y., El Sayeh, B. M., & Abdallah, D. M. (2013). Additional Antiepileptic Mechanisms of Levetiracetam in Lithium-Pilocarpine Treated Rats. *PLoS ONE*, 8(10), e76735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076735>
- Clifford, D. B., Olney, J. W., Maniotis, A., Collins, R. C., & Zorumski, C. F. (1987). The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience*, 23(3), 953-968. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90171-0](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90171-0)
- Contreras-García, I. J., Cárdenas-Rodríguez, N., Romo-Mancillas, A., Bandala, C., Zamudio, S. R., Gómez-Manzo, S., Hernández-Ochoa, B., Mendoza-Torreblanca, J. G., & Pichardo-Macías, L. A. (2022). Levetiracetam Mechanisms of Action: From Molecules to Systems. *Pharmaceuticals*, 15(4), Art. 4. <https://doi.org/10.3390/ph15040475>
- Cruz-Cruz, M. del R., Gallardo-Elías, J., Paredes-Solís, S., Legorreta-Soberanis, J., Flores-Moreno, M., Andersson, N., Cruz-Cruz, M. del R., Gallardo-Elías, J., Paredes-Solís, S., Legorreta-Soberanis, J., Flores-Moreno, M., & Andersson, N. (2017). Factores asociados a epilepsia en niños en México: Un estudio caso-control. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 74(5), 334-340. <https://doi.org/10.1016/j.bmhix.2017.05.006>
- Custer, K. L. (2006). Synaptic Vesicle Protein 2 Enhances Release Probability at Quiescent Synapses. *Journal of Neuroscience*, 26(4), 1303-1313. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2699-05.2006>
- Devinsky, O., Vezzani, A., O'Brien, T. J., Jette, N., Scheffer, I. E., de Curtis, M., & Perucca, P. (2018). Epilepsy. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 18024. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.24>
- Engel, J. (1996). Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, 26(1), 141-150. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(96\)00043-5](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(96)00043-5)

- Faure, J.-B., Akimana, G., Carneiro, J. E. M., Cosquer, B., Ferrandon, A., Geiger, K., Koning, E., Penazzi, L., Cassel, J.-C., & Nehlig, A. (2013). A comprehensive behavioral evaluation in the lithium-pilocarpine model in rats: Effects of carisbamate administration during status epilepticus. *Epilepsia*, *54*(7), 1203-1213.
<https://doi.org/10.1111/epi.12219>
- Feria-Romero, I. A., Alonso-Vanegas, M., Rocha-Arrieta, L., Villeda-Hernández, J., Escalante-Santiago, D., Lorigados-Pedré, L., Morales-Chacón, L., Grijalva-Otero, I., & Orozco-Suárez, S. (2013). Mecanismos de neurodegeneración en la epilepsia del lóbulo temporal. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, *51*(2), 137-148.
<https://doi.org/10.4067/S0717-92272013000200007>
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Jr, J. E., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., & Tomson, T. (2014). *Definición clínica práctica de la epilepsia*. 8.
- Giovannoni, F., & Quintana, F. J. (2020). The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. *Trends in Immunology*, *41*(9), 805-819. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.007>
- Itoh, K., Taniguchi, R., Matsuo, T., Oguro, A., Vogel, C., Yamazaki, T., & Ishihara, Y. (2019). Suppressive effects of levetiracetam on neuroinflammation and phagocytic microglia: A comparative study of levetiracetam, valproate and carbamazepine. *Neuroscience letters*, *708*, 134363.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134363>
- Izquierdo, A. Y. (2005). *Crisis convulsivas. Concepto, clasificación y etiología*. 6.
- Janz, R., Goda, Y., Geppert, M., Missler, M., & Südhof, T. C. (1999). SV2A and SV2B Function as Redundant Ca²⁺ Regulators in Neurotransmitter Release. *Neuron*, *24*(4), 1003-1016. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81046-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81046-6)
- Jessen, K. R. (2004). Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *36*(10), 1861-1867. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.023>

- Kim, J. E., Choi, H. C., Song, H. K., Jo, S. M., Kim, D. S., Choi, S. Y., Kim, Y. I., & Kang, T. C. (2010). Levetiracetam inhibits interleukin-1 beta inflammatory responses in the hippocampus and piriform cortex of epileptic rats. *Neuroscience letters*, 471(2), 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.01.018>
- Klein, P., & Tyrlikova, I. (2020). No prevention or cure of epilepsy as yet. *Neuropharmacology*, 168, 107762. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107762>
- Labh, R., Gupta, R., Narang, M., Halder, S., & Kar, R. (2021). Effect of valproate and add-on levetiracetam on inflammatory biomarkers in children with epilepsy. *Epilepsy & Behavior: E&B*, 125, 108358. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.108358>
- Linnerbauer, M., Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2020). Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. *Neuron*, 108(4), 608-622. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.012>
- López-Hernández, E., & Solís, H. (2012). Epilepsia del lóbulo temporal y las neuronas hipocámpales de las áreas CA1 y CA3. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 55(5), 16-25.
- López-Meraz, M.-L., Medel-Matus, J.-S., & Niquet, J. (2016). Inflammatory Cytokines as Targets for Epilepsy Drug Therapy. En A. Talevi & L. Rocha (Eds.), *Antiepileptic Drug Discovery* (pp. 3-22). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6355-3_1
- Lynch, B. A., Lambeng, N., Nocka, K., Kensel-Hammes, P., Bajjalieh, S. M., Matagne, A., & Fuks, B. (2004). The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(26), 9861-9866. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308208101>
- Lyseng-Williamson KA. Levetiracetam: a review of its use in epilepsy. *Drugs*. 2011 Mar;71(4):489–514.
- Malmgren, K., & Thom, M. (2012). Hippocampal sclerosis—Origins and imaging. *Epilepsia*, 53(s4), 19-33. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03610.x>

- Meehan, A. L., Yang, X., McAdams, B. D., Yuan, L., & Rothman, S. M. (2011). A new mechanism for antiepileptic drug action: Vesicular entry may mediate the effects of levetiracetam. *Journal of Neurophysiology*, *106*(3), 1227-1239.
<https://doi.org/10.1152/jn.00279.2011>
- Meehan, A. L., Yang, X., Yuan, L.-L., & Rothman, S. M. (2012). Levetiracetam has an activity-dependent effect on inhibitory transmission: Levetiracetam Affects GABA Release. *Epilepsia*, *53*(3), 469-476. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03392.x>
- Mendoza-Torreblanca, J. G., Vanoye-Carlo, A., Phillips-Farfán, B. V., Carmona-Aparicio, L., & Gómez-Lira, G. (2013). Synaptic vesicle protein 2A: Basic facts and role in synaptic function. *European Journal of Neuroscience*, *38*(11), 3529-3539.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12360>
- Parkhurst, C. N., & Gan, W.-B. (2010). Microglia dynamics and function in the CNS. *Current Opinion in Neurobiology*, *20*(5), 595-600. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.07.002>
- Rana, A., & Musto, A. E. (2018). The role of inflammation in the development of epilepsy. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 144. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1192-7>
- Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y., & Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, *58*(4), 512-521. <https://doi.org/10.1111/epi.13709>
- Sirven, J. I., & Osborne, P. (2014). *What is Epilepsy? Disease or Disorder?* Epilepsy Foundation. <https://www.epilepsy.com/learn/about-epilepsy-basics/what-epilepsy>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*(1), 7-35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Stafstrom, C.E., Hagerman, P.J. and Pessah, I.N. (2010), Epilepsy in autism spectrum disorders. *Epilepsia*, *51*: 78-78. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02864.x>

- Surges, R., Volynski, K. E., & Walker, M. C. (2008). Review: Is levetiracetam different from other antiepileptic drugs? Levetiracetam and its cellular mechanism of action in epilepsy revisited. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 1(1), 13-24.
<https://doi.org/10.1177/1756285608094212>
- Thom, M. (2014). Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(5), 520-543.
<https://doi.org/10.1111/nan.12150>
- Vasile, F., Dossi, E., & Rouach, N. (2017). Human astrocytes: Structure and functions in the healthy brain. *Brain Structure and Function*, 222(5), 2017-2029.
<https://doi.org/10.1007/s00429-017-1383-5>
- Vezzani, A., French, J., Bartfai, T., & Baram, T. Z. (2011). The role of inflammation in epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, 7(1), 31-40.
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.178>
- Vezzani, A., Lang, B., & Aronica, E. (2016). Immunity and Inflammation in Epilepsy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(2), a022699.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022699>
- Wang, F., Qi, X., Zhang, J., & Huang, J. H. (2020). Astrocytic modulation of potassium under seizures. *Neural regeneration research*, 15(6), 980–987.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.270295>
- Wake, H., Moorhouse, A. J., & Nabekura, J. (2011). Functions of microglia in the central nervous system – beyond the immune response. *Neuron Glia Biology*, 7(1), 47-53.
<https://doi.org/10.1017/S1740925X12000063>
- Webster, K. M., Sun, M., Crack, P., O'Brien, T. J., Shultz, S. R., & Semple, B. D. (2017). Inflammation in epileptogenesis after traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-1000-0>
- WHO. (2022). Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
- Wylie, T., Sandhu, D. S., & Murr, N. (2022). Status Epilepticus. En *StatPearls*. StatPearls

Anexos

ANEXO 1

Tabla 1. Escala de Racine

| Estado | Conducta |
|---------------|--|
| 0 | Inmovilidad, piloerección, excitación e hiperventilación. |
| 1 | Movimiento de hocico y lengua, vibrisas, salivación y escalofríos. |
| 2 | Movimientos de cabeza, rigidez en la cola. |
| 3 | Clonus de extremidades anteriores, masticación y sacudidas. |
| 4 | Crisis tónico-clónicas. |
| 5 | Crisis tónico-clónicas con pérdida de postura y saltos |

descontrolados.

Adaptado de "Modification of seizure activity by electrical stimulation: I. after-discharge threshold", por Racine, 1972.