



# Oxidative stress, Nrf2 and its role in Epilepsy

## Estrés oxidativo, nrf2 y su papel en la epilepsia

Rodríguez-Ramírez Raúl<sup>a,b</sup> | Pérez-González Cuahutémoc<sup>c</sup> | Yescas-Gómez Petra<sup>d</sup>  
Méndez-Armenta Marisela<sup>a</sup>✉

<sup>a</sup> Laboratorio de Neuropatología Experimental, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

<sup>b</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana.

<sup>c</sup> Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma de Metropolitana-Unidad Xochimilco.

<sup>d</sup> Departamento de Genética, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

### Correspondence

Dra. Marisela Méndez Armenta. Laboratorio de Neuropatología Experimental. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Insurgentes Sur 3877 Col. La Fama, Alcaldía Tlalpan, C.P. 14269, Ciudad de México, México.

✉ mmendezarmenta@hotmail.com

### Abstract

Epilepsy is a neurological disorder characterized by a long-lasting predisposition to generate epileptic seizures that affects millions of people around the world. The International League Against Epilepsy (ILAE) has presented an operational classification of the types of seizures depending on the etiology of the disease. A common denominator of the different types of epilepsy is the existence of imbalance of excitation and inhibition as the main mechanism of the transition from normal brain function to seizure. An imbalance between the glutamate and gamma-aminobutyric acid neurotransmitter systems can cause hyperexcitability, excitotoxicity, proliferation of reactive oxygen species and reactive nitrogen species, oxidative stress, mitochondrial damage and subsequently cell death. Oxidative stress plays a fundamental role in the mechanisms of action in the disease, since neuronal hyperexcitability plays a fundamental role in the initiation and progression of epilepsy. To avoid the damage generated by oxidative stress, cells are equipped with a variety of antioxidants that serve to counteract the effect of oxidants in which enzymatic and non-enzymatic components are involved. Enzyme compounds are regulated by Nrf2, which under oxidative stress conditions bind to antioxidant response elements and thus increases the induction of cytoprotective enzymes mediated by this factor in astrocytes and neurons. For the study of the role that oxidative stress plays in epilepsy, animal models are used that reproduce these disease conditions. This review summarizes the evidence on the role that Nrf2 plays in epilepsy by mediating the activation of antioxidant systems as cellular protectors against oxidative stress.

**Key words:** *Epilepsy, Nrf2, oxidative stress, experimental models, reactive oxygen species*

### Resumen

La epilepsia es un desorden neurológico caracterizado por una predisposición duradera para generar ataques epilépticos que afecta a millones de personas alrededor del mundo. La liga internacional contra la epilepsia (ILAE por sus siglas en inglés) ha presentado una clasificación operativa de los tipos de ataques dependiendo de la etiología de la enfermedad. Un común denominador de los diferentes tipos de epilepsia es la existencia de desequilibrio de excitación e inhibición como el mecanismo principal de la transición de la función cerebral normal a la convulsión. Un desequilibrio entre los sistemas de neurotransmisores del glutamato y del ácido gamma-aminobutírico puede provocar hiperexcitabilidad, excitotoxicidad, proliferación de especies reactivas del oxígeno y especies reactivas del nitrógeno, estrés oxidante, daño mitocondrial y posteriormente, muerte celular. El estrés oxidante tiene un papel fundamental en los mecanismos de acción en la enfermedad ya que la hiperexcitabilidad neuronal desempeña un papel fundamental en el inicio y progresión de la epilepsia. Para evitar el daño generado por el estrés oxidante, las células están equipadas con una variedad de antioxidantes que sirven para contrarrestar el efecto de los oxidantes en el cual se encuentran involucrados componentes enzimáticos y no enzimáticos. Los compuestos enzimáticos están regulados por el factor nuclear eritroide 2, que en condiciones de estrés oxidante se unen a los elementos de respuesta antioxidante y de esta manera se incrementa la inducción de enzimas citoprotectoras mediadas por este factor, en astrocitos y neuronas. Para el estudio del papel que juega el estrés oxidante en la epilepsia, se recurre a modelos animales que emulen estas condiciones de la enfermedad. La presente revisión resume la evidencia sobre el papel que juega el Nrf2 en la epilepsia mediando la activación de sistemas antioxidantes como protectores celulares contra el estrés oxidativo.

**Palabras clave:** *epilepsia, Nrf2, estrés oxidativo, modelos experimentales, especies reactivas de oxígeno*



## Introducción

La epilepsia es un desorden neurológico caracterizado por una predisposición duradera para generar ataques epilépticos y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de esta afección<sup>1</sup>. Esta enfermedad afecta a millones de personas alrededor del mundo<sup>2</sup> siendo los países en vías de desarrollo los más afectados<sup>3</sup>. La epilepsia puede ser dividida principalmente en epilepsia del lóbulo temporal mesial y epilepsia del lóbulo temporal y su principal característica clínica es la aparición de crisis convulsivas<sup>4</sup>. Una convulsión está definida como una aparición transitoria de signos y/o síntomas debido a una actividad neuronal anormal excesiva o sincrónica en el cerebro<sup>5</sup> y pueden tener un origen generalizado o localizado<sup>6</sup>. El estrés oxidante tiene un papel fundamental en los mecanismos de acción en la enfermedad ya que la hiperexcitabilidad neuronal y los daños generados por el estrés oxidante producido por la generación excesiva de radicales libres podrían jugar un papel clave en el inicio y progresión de la epilepsia<sup>4</sup>. El factor de transcripción nuclear eritroide 2 (Nrf2) es un elemento regulador transcripcional<sup>7</sup> que mantiene el estado redox celular en condiciones de estrés oxidativo celular regulando la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes tales como: Glutatión peroxidasa, catalasa, metalotioneinas y la superóxido dismutasa<sup>8</sup>. El objetivo principal de este trabajo es resumir evidencia reciente sobre el papel que juega el Nrf2 en la epilepsia mediando la activación de sistemas antioxidantes como protección celular contra el estrés oxidativo.

## Generalidades de Epilepsia

### a) Epidemiología

La epilepsia afecta a cerca de 50 millones de personas alrededor del mundo con un estimado de 2 a 3 millones en los Estados Unidos, 6 millones en Europa y 40 millones en países en vías de desarrollo<sup>2</sup>. En países desarrollados, la incidencia es de cerca de 50/100000/año individuos mientras que en países de bajos recursos la enfermedad aumenta cada año. Existe una variación geográfica en la incidencia de síndromes epilépticos que probablemente estén asociados con factores genéticos y ambientales, aunque todavía no se ha establecido completamente la causalidad<sup>3</sup>. Las tasas de incidencia específicas por edad han cambiado, con un decremento en grupos jóvenes y un incremento en personas mayores de 60 años<sup>3</sup>. Sin embargo, la mortalidad acumulada a los 45 años todavía involucra al 25% de los pacientes epilépticos que desarrollan epilepsia en la niñez. La incidencia acumulada después de la suma de la incidencia

específica por edad, por ejemplo, una población islandesa mostró una incidencia acumulada del 1% entre los 0 y los 15 años, del 1.5% después de los 55 años, del 3.6% en los >75 años y el 4.5% en los 85 años o más. En cuanto a la incidencia, surgen dos picos, el primero en la población pediátrica de 0 a 5 años y el segundo en los mayores de 75 años. La prevalencia de convulsiones focales varía del 35 al 50% cuando se dispone de estudios electroencefalográficos. En Europa, la proporción de convulsiones generalizadas varía del 17% al 60% en comparación con el 2% al 8% de las convulsiones no clasificadas<sup>9</sup>. En México la prevalencia de epilepsia, se considera que alcanza un promedio de 15/1,000; la mayoría de esos casos corresponde a epilepsia con convulsiones clónicas generalizadas, aproximadamente 50% corresponde a epilepsia con crisis parciales (secundarias en el lóbulo temporal y un número menor en el lóbulo frontal)<sup>10</sup>.

### b) Definición y clasificación

La epilepsia es un trastorno neurológico caracterizado por convulsiones no provocadas y recurrentes<sup>11</sup> con consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales<sup>1</sup>. La etiología de la epilepsia es con frecuencia desconocida, sin embargo, pueden clasificarse en: idiopáticas o sin causa subyacente, criptogénicas o de etiología desconocida y sintomáticas o secundarias a malformaciones, tumores, infecciones, entre otros<sup>12</sup>; dependiendo de su origen, se dividirán en parciales o focales: parciales cuando su origen se encuentra en una región acotada de la corteza cerebral a veces denominada foco, o generalizadas, cuando su origen se localiza en toda o gran parte de la corteza cerebral y, por tanto, el lugar específico de inicio no puede ser identificado<sup>13</sup>. La Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés) ha presentado una clasificación operativa de los tipos de crisis y epilepsias<sup>5</sup>, esta clasificación es importante para el diagnóstico, el tratamiento y la comprensión de las convulsiones y las epilepsias<sup>14</sup>; esta clasificación de la ILAE, la última de una serie de propuestas publicadas en los últimos 30 años, presenta una estructura multinivel (tipos de crisis, tipos de epilepsia, síndromes de epilepsia) que permite diferentes usos y combina las crisis previamente separadas tipos y esquemas de epilepsias en una sola clasificación<sup>15</sup>. La clasificación de las convulsiones comienza determinando si las manifestaciones iniciales de la convulsión son focales o generalizadas. Las convulsiones focales se clasifican de acuerdo con el nivel de conciencia del individuo, las características motoras o no motoras más prominentes de la convulsión y si la convulsión focal evoluciona a una convulsión tónico-clónica bilateral<sup>14</sup>. Así mismo, las convulsiones generalizadas se clasifican según manifestaciones motoras o no motoras.

Las convulsiones motoras son convulsiones tónico-clónicas u otras convulsiones motoras. Las convulsiones generalizadas no motoras se refieren principalmente a convulsiones de ausencia. De manera similar a la clasificación de las convulsiones, las epilepsias se pueden clasificar como focales o generalizadas. Además, el nuevo sistema de clasificación reconoce dos nuevas categorías: epilepsia combinada generalizada, focal y epilepsia desconocida<sup>14</sup>. De esta manera, aunque existen más de 40 tipos de síndromes epilépticos, se clasifican en dos categorías principales: generalizados y parciales; el primero describe convulsiones que comienzan simultáneamente en ambos hemisferios cerebrales, mientras que las convulsiones en el último se originan en uno o más focos localizados, pero pueden extenderse para afectar a todo el cerebro<sup>12</sup>. La Epilepsia de Lóbulo Temporal (ELT) es el síndrome habitual e intratable en adultos, aproximadamente un tercio de los pacientes con ELT continúan experimentando convulsiones a pesar de tomar medicamentos antiepilépticos<sup>12</sup>. La ELT puede ser dividida principalmente en dos tipos (1) Epilepsia del Lóbulo Temporal Mesial (ELTM) que involucra estructuras cerebrales como al hipocampo, parahipocampo, el giro dentado y la amígdala; (2) ELT que involucra el neocórtex siendo esta la más prominente y común de las epilepsias adquiridas<sup>4</sup>.

### c) Mecanismos básicos de acción

La epilepsia es una condición paroxística caracterizada por convulsiones transitorias repetidas separadas por períodos interictales más largos<sup>16</sup>. La ictogénesis describe los procesos de transición del estado interictal a una convulsión. Los procesos incluyen un estado preictal, con signos clínicos específicos y una electrofisiología distinta que puede brindar oportunidades para anticipar, o incluso prevenir, las convulsiones; aunque los síndromes epilépticos difieren desde el punto de vista fisiopatológico, estos comparten características comunes relacionadas con la ictogénesis<sup>16</sup>. El proceso de epileptogénesis involucra tres etapas: la lesión inicial, el período latente libre de crisis y el desarrollo de ELT<sup>17</sup>. Se han propuesto varias teorías con respecto a los mecanismos que contribuyen a la progresión de la epilepsia, incluidas las etiologías primarias progresivas, como la expansión de las lesiones y la neurodegeneración progresiva, el desarrollo de resistencia farmacológica y la plasticidad/inflamación inducida por las convulsiones<sup>18</sup>. El proceso epileptogénico es el resultado de un desequilibrio entre la actividad excitadora e inhibidora dentro de una red neuronal, de modo que es probable que funcione de manera excesiva, hipersincrónica y oscilatoria, lo que, cuando se mantiene, interrumpe el procesamiento neuronal normal y es capaz de alterar otras redes de neuronas<sup>19</sup>. Las epilepsias generalizadas, presentan

redes epileptogénicas que están ampliamente distribuidas, involucrando estructuras talamocorticales bilateralmente<sup>20</sup>; mientras que, en las epilepsias focales, las redes involucran circuitos neuronales en un hemisferio, comúnmente límbico o neocortical; el desequilibrio entre la excitación y la inhibición que resulta en redes epileptogénicas no es necesariamente solo un aumento de la excitación o una pérdida de inhibición<sup>21</sup>.

Entre los mecanismos propuestos de epileptogénesis, los más importantes son: estrés oxidativo, deterioro de la regulación mediada por actividad del receptor de dopamina (DA), procesos inflamatorios que afectan la integridad de la matriz neuronal extracelular, la muerte celular neuronal, el impacto de las hormonas, el mecanismo de la ritmicidad circadiana<sup>22</sup> así como un desequilibrio entre los sistemas de neurotransmisores del glutamato y del ácido gamma-aminobutírico (GABA) que provoca hiperexcitabilidad<sup>23</sup>. Los procesos de transición que incorporan retroalimentación positiva, como la desinhibición dependiente de la actividad, podrían proporcionar estas características de sincronización únicas<sup>24</sup>; además, se producen cambios funcionales y estructurales en la membrana postsináptica, alterando así los canales de conductancia, lo que favorece el desarrollo de un cambio despolarizante y una mayor excitabilidad. Existe evidencia, de que los canales de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, y Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje favorecen las descargas paroxísticas de grupos neuronales determinados, lo que lleva a una re-estructuración de las arborizaciones sinápticas y con ello al desarrollo de zonas epileptogénicas, las cuales a su vez se ven limitadas por los mecanismos inhibitorios compensadores<sup>25</sup>. Las neuronas epilépticas parecen tener una mayor conductancia de Ca<sup>2+</sup>, puede ser que se utilicen canales de Ca<sup>2+</sup> latentes y que la eficacia de los canales de Ca<sup>2+</sup> se incremente o que el número de canales de Ca<sup>2+</sup> esté crónicamente elevado<sup>23</sup>. El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), especies reactivas de nitrógeno (ERNs) y la capacidad de desintoxicar fácilmente los reactivos intermedios en un sistema biológico<sup>26</sup>. La generación excesiva de EROs puede causar daño a las células neuronales induciendo la muerte celular a través de una vía apoptótica o necrótica. La evidencia reciente ha sugerido un vínculo íntimo entre el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial con el desarrollo de muerte neuronal en diversos trastornos neurológicos, incluida la epilepsia. La disfunción mitocondrial incluye insuficiencia bioenergética y aumento del calcio citosólico, estrés oxidativo (producción excesiva de radicales libres y síntesis deficiente de antioxidantes, especialmente glutatión), apertura de poros de transición de la permeabilidad mitocondrial y liberación de proteínas clave

en el citosol que desencadenan vías de muerte celular como la apoptosis<sup>27</sup>.

## Estrés Oxidativo

### a) RL, ERO, ERN

Los radicales libres (RL) son cualquier especie independiente que contienen uno o más electrones desapareados en sus orbitales atómicos o moleculares, son generalmente inestables, de vida media corta pero químicamente reactivos<sup>28</sup>; la cantidad de RL es determinada principalmente en la cadena de fosforilación oxidativa mitocondrial. El término especies reactivas de oxígeno (ERO) es un término colectivo que involucra RL derivados del oxígeno, así como no radicales derivados de la reducción de oxígeno molecular.

El estrés oxidativo se produce cuando existe un desequilibrio entre la generación excesiva de radicales libres y una disminución de la actividad antioxidante enzimática resultando en daño celular. Las ROs son mediadores importantes para una variedad de procesos celulares, incluyendo adhesión celular, respuesta inmune, apoptosis, crecimiento y diferenciación celular y actúan también como segundos mensajeros en la señalización intracelular<sup>29</sup>; sin embargo, el daño oxidante ocurre cuando la generación de EROs supera los límites de eliminación de estos por las enzimas antioxidantes. Las principales EROs celulares son: anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), y peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), incluso cuando el radical superóxido es relativamente no reactivo es considerado una EROs primaria, ya que puede interactuar con otras moléculas para producir más EROs secundarios tales como el radical hidroxilo<sup>30</sup>. La evidencia reciente ha sugerido una interacción entre el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial con el desarrollo de muerte neuronal en diversos trastornos neurológicos, incluida la epilepsia<sup>31</sup>.

El estrés nitrosante es el resultado de un incremento en las especies reactivas de nitrógeno (ERN) dentro de la célula las cuales juegan un papel fisiológico importante, sin embargo, pueden ser nocivas para las células debido a su capacidad para interrumpir una variedad de procesos biológicos esenciales<sup>32, 33</sup>. El óxido nítrico (ON) reacciona rápidamente con  $O_2^{\bullet-}$ , produciendo el potente oxidante, ONOO<sup>-</sup> que protona a un pH relevante para formar ácido peroxinitroso ONOOH<sup>32</sup> produciendo daños a las biomoléculas como la nitración de proteínas<sup>33</sup>. La producción anormal de ERN se da principalmente por la activación de la óxido nítrico sintasa (ONS) a través del aumento de los niveles de  $Ca^{2+}$

celular; la familia de isoenzimas de la ONS consta de 3 tipos: la neuronal (ONS<sub>n</sub>, ONS1), la ONS inducible (ONS<sub>i</sub>, ONS2) y la ONS endotelial (ONS<sub>e</sub>, ONS3); estas enzimas catalizan la generación de ON, utilizando L-arginina, oxígeno y NADPH como sustratos<sup>34</sup>. El ON es importante no solo en procesos fisiológicos sino también en muchas enfermedades. En la sangre, donde hay oxihemoglobina dentro de los glóbulos rojos; el ON se oxida a nitrito ( $NO_2$ ) y nitrato ( $NO_3$ ), por esta razón, el  $NO_3$  y el  $NO_2$  se emplean a menudo como marcadores de la producción de NO en muestras biológicas, asumiendo que el  $NO_3$  y el  $NO_2$  son productos finales inertes de la oxidación del NO<sup>34</sup>.

### b) Daño mitocondrial

Las mitocondrias juegan un papel clave en el suministro de ATP a las células a través de la fosforilación oxidativa, así como en la síntesis de moléculas biológicas esenciales<sup>35</sup>. El transporte de electrones a través de los complejos I-IV en la membrana mitocondrial interna involucra una serie de reacciones redox acopladas, las cuales proveen la energía necesaria para generar un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna<sup>36</sup>. La cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial incluye los complejos I-IV, así como los transportadores de electrones ubiquinona y citocromo C. Hay dos vías de transporte de electrones en la CTE: Complejo I/III/IV, con NADH como sustrato y complejo II/III/IV, con ácido succínico como sustrato. El flujo de electrones se acopla con la generación de un gradiente de protones a través de la membrana interna y la energía acumulada en el gradiente de protones es utilizada por el complejo V (ATP sintasa) para producir ATP<sup>37</sup> a partir de ADP mientras que los protones reingresan a la matriz a través de la ATP sintetasa (complejo V). El proceso completo es llamado fosforilación oxidativa<sup>36</sup>. En el proceso de fosforilación oxidativa tienen lugar varias reacciones redox catalizadas por enzimas; una fosforilación oxidativa ineficaz puede generar EROs, lo que conduce a una disfunción mitocondrial. Se ha reportado, que el metabolismo redox mitocondrial, el metabolismo de los fosfolípidos y las vías proteolíticas son la principal y potencial fuente de radicales libres<sup>38</sup>. Una concentración más baja de EROs es esencial para la señalización celular normal, mientras que la concentración más alta y la exposición prolongada de ERO causan daño a macromoléculas celulares como DNA, lípidos y proteínas, lo que finalmente resulta en necrosis y muerte celular apoptótica<sup>35</sup>. La producción de radicales superóxido mitocondriales se produce principalmente en el complejo I y el complejo III; en condiciones metabólicas normales, el complejo III es el sitio principal de producción de ROS, por lo que el ataque de los radicales libres suele ocurrir

en el complejo de la cadena respiratoria mitocondrial. Los complejos I y III también se consideran lugares de formación de superóxido y otras especies reactivas de oxígeno<sup>39</sup>. Una alta producción de EROs o una remoción defectuosa de EROs por el sistema de defensa mitocondrial, resulta en un daño oxidante a: ADN mitocondrial (ADNmt), el daño oxidante al ADNmt podría comprometer las subunidades de la cadena respiratoria codificadas por el ADNmt, estableciéndose así un círculo vicioso de estrés oxidante y una falla bioenergética que es racional con la teoría del envejecimiento mitocondrial<sup>36</sup>.

### c) Excitotoxicidad

Se considera que la excitotoxicidad, es un mecanismo específico de neurotoxicidad que conlleva a muerte celular y esta mediado por el glutamato es un mecanismo importante de muerte celular en una serie de enfermedades del sistema nervioso central que incluyen accidente cerebrovascular, traumatismo cerebral, epilepsia y trastornos neurodegenerativos crónicos<sup>40</sup>.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador y su interacción con receptores de membrana específicos es responsable de muchas funciones neurológicas. Los efectos excitadores del glutamato se ejercen a través de la activación de tres tipos principales de receptores ionotrópicos y varias clases de receptores metabotrópicos ligados a proteínas G. Los principales receptores ionotrópicos activados por el glutamato se conocen comúnmente como receptores del ácido N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato (AMPA) y del ácido kaínico (AK), estos receptores ionotrópicos son canales iónicos activados por ligandos permeables a varios cationes que al activarse abren el poro del canal iónico para producir un flujo o reflujos de iones despolarizando neuronas<sup>41</sup>, provocando que se disparen potenciales de acción<sup>40</sup>. Esto conduce a una alteración del entorno iónico intracelular, cuya característica mejor conocida más importante es la entrada de sodio, cloruro y  $\text{Ca}^{2+}$ , el exceso de iones  $\text{Ca}^{2+}$  activa cascadas de señalización intracelulares dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  41. Aunque los incrementos fisiológicos del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular son importantes para el funcionamiento celular normal, el influjo excesivo de  $\text{Ca}^{2+}$  junto con cualquier liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los compartimentos intracelulares puede conducir a la muerte celular. Por lo que la desregulación de  $\text{Ca}^{2+}$  es fundamental para la neurodegeneración, el mecanismo preciso por el cual los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  en realidad median la excitotoxicidad es aún poco claro<sup>42</sup>.

Por otro lado, se ha investigado el posible papel de los transportadores de iones  $\text{Cl}^-$  en la excitotoxicidad neuronal ya que el movimiento de  $\text{Cl}^-$  es un componente central de la

respuesta excitotóxica aguda en las neuronas y se ha observado un aumento significativo de la concentración intracelular de  $\text{Cl}^-$  en las neuronas del hipocampo durante la neurotoxicidad inducida por glutamato y privación de oxígeno/glucosa. Los estudios muestran que el co-transportador NKCC1 contribuye al daño neuronal isquémico al facilitar la entrada excesiva de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  durante la excitotoxicidad mediada por NMDA. La inhibición de la actividad de NKCC1 reduce la neurotoxicidad a través del glutamato y atenúa significativamente la muerte neuronal inducida por una privación de oxígeno / glucosa<sup>43</sup>.

En resumen, la liberación excesiva de glutamato puede conducir a una desregulación de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , desencadenando la producción de radicales libres y estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y eventualmente muerte celular, siendo el estrés oxidativo uno de los eventos fundamentales en la excitotoxicidad. Aunque existe un consenso en considerar la excitotoxicidad como una característica importante en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, cada vez hay más evidencia que apunta al papel relevante de este mecanismo patológico en otras enfermedades que afectan al sistema nervioso central 33. El daño cerebral producido por una primera convulsión causa excitotoxicidad, neuroinflamación y una elevada producción de EROs y ERNs durante el estatus epiléptico, supera el mecanismo de defensa antioxidante celular lo que conduce a una disfunción mitocondrial, daño al DNA y daño mitocondrial; esto, a su vez, afecta la síntesis de varios complejos enzimáticos que participan en la cadena de transporte de electrones. Los efectos resultantes que ocurren durante la epileptogénesis incluyen peroxidación de lípidos, gliosis reactiva, neurodegeneración del hipocampo, reorganización de las redes neuronales e hipersincronía, estos factores predisponen al cerebro a convulsiones recurrentes espontáneas, que finalmente se pueden convertir en ELT<sup>44</sup>.

### d) Muerte Celular

Las convulsiones prolongadas pueden provocar disfunción mitocondrial y un aumento de la producción de EROs y ON que preceden a la muerte de las células neuronales y provocan la epileptogénesis posterior<sup>45</sup>. La evidencia ha identificado la participación de la apoptosis como uno de los principales mecanismos por el cual mueren las neuronas después de lesiones cerebrales como el accidente cerebrovascular y el estatus epiléptico<sup>12</sup>. Así mismo la mitocondria es una participante importante asociada con este tipo de muerte celular, la vía apoptótica mitocondrial intrínseca puede contribuir a la neuropatología de la epilepsia, particularmente en el hipocampo<sup>45</sup>.

La excitotoxicidad mediada por glutamato es un mecanismo contribuyente principal para la muerte celular por necrosis, pero las convulsiones también activan las vías de muerte celular por apoptosis. Las vías de señalización se inician típicamente después de la alteración de la función de la mitocondria (vía intrínseca) o por receptores de muerte activados y expresados en la superficie celular (vía extrínseca), con cascadas de señalización coordinadas en parte por las familias de genes Bcl-2 y caspasas<sup>46</sup>. Evidencia reciente ha revelado que la muerte de las células excitotóxicas está regulada por la familia de proteínas del Bcl-2, que se encuentra integrada por miembros pro-apoptóticos (Bad, Bax y Bim) y antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xl y Bcl-w); los cuales no solo median la vía intrínseca de la apoptosis al controlar la integridad de la membrana externa mitocondrial, sino que también controlan la homeostasis del  $Ca^{2+}$  neuronal<sup>47</sup>. Es probable que al menos dos mecanismos contribuyan a activar la vía apoptótica mitocondrial intrínseca después de las convulsiones. Se sabe que la carga de  $Ca^{2+}$  mitocondrial sigue a la actividad convulsiva; la agrupación de partículas de Bax también se ha visualizado en la membrana externa de las mitocondrias dentro de las 2h posteriores a una convulsión, y esto coincide con el momento de la liberación del citocromo C. Un tercer mecanismo que implica la liberación del factor inductor de apoptosis mediada por calpaína también podría ser particularmente relevante. Se ha demostrado que el citocromo C liberado se une a APAF-1 en el hipocampo después de las convulsiones, seguido de activación de caspasa-9 y una mayor actividad proteolítica<sup>12</sup>. Los modelos experimentales y los estudios clínicos han mostrado que una convulsión prolongada o un estatus epiléptico puede causar muerte neuronal en el cerebro siendo la pérdida de células dentro del cuerno de Ammon en el hipocampo la lesión más comúnmente observada<sup>12</sup>, estos hallazgos apoyan la teoría de que la activación del factor nuclear-kB regula al alza la expresión del gen de la SON 2 con la correlación temporal de la reducción dependiente del ON, del anión superóxido y del peroxinitrito derivado de SON 2 en la actividad del Complejo I mitocondrial, que conduce a la muerte de células neuronales apoptóticas en el hipocampo<sup>45</sup>. Hallazgos neuropatológicos en la amígdala obtenidos de pacientes con ELTM indican grados variables de daño histopatológico además de la pérdida neuronal y se observa gliosis en los núcleos lateral y basal<sup>48</sup>. Mientras que los estudios en modelos experimentales han mostrado más específicamente que las regiones cercanas a la amígdala tales como: la división medial del núcleo lateral, el núcleo basal accesorio, el núcleo cortical posterior, porciones del núcleo cortical anterior y medial así como el cerebelo y la corteza

cerebral son más sensibles al daño neuronal inducido por el estado epiléptico<sup>12</sup>.

## Factor de Transcripción Nrf2

### a) Definición

El factor 2 relacionado con el factor nuclear E2 o factor de transcripción eritroide Nrf2 (*the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 por sus siglas en inglés*), pertenecen a una familia de proteínas básicas con un característico "zipper" o cierre de leucinas (bZip) en la región C-terminal, el cual actúa a través del elemento de respuesta antioxidante (antioxidant response element, ARE en inglés) para activar la transcripción de genes jugando un papel fundamental en el sistema antioxidante de defensa contra el estrés oxidativo<sup>49</sup>. El Nrf2 fue clonado por primera vez en 1994 e identificado como miembro de la familia de factores de transcripción de cierre de leucina de región básica cap'n'collar (CNC) humana, que también incluye factor nuclear eritroide 2 (NF-E2), factor nuclear eritroide 2 relacionado factor 1 (Nrf1), factor nuclear 3 relacionado con el factor eritroide 2 (Nrf3) 7. El gen de la proteína Nrf2 está situado en el cromosoma 2q31.2.; y contiene exones de acuerdo a secuencia de referencia NM0061614.4 GenBank de la base de datos NCBI, los transcriptos humanos de NFE2L2 contienen cinco exones interrumpidos por cuatro intrones extendidos por más de 11kb, la presencia de un primer intrón grande que abarca más de 6kb (secuencias de referencia OMIM). Esto difiere de la base de datos más reciente Ace View, donde el gen Nrf2 contiene 40 intrones discretos y produce<sup>38</sup> secuencias de mRNA distintas, de las cuales<sup>31</sup> son variantes de splicing alternativo (corte y empalmadas alternativo) y 7 son formas no empalmadas<sup>50</sup>.

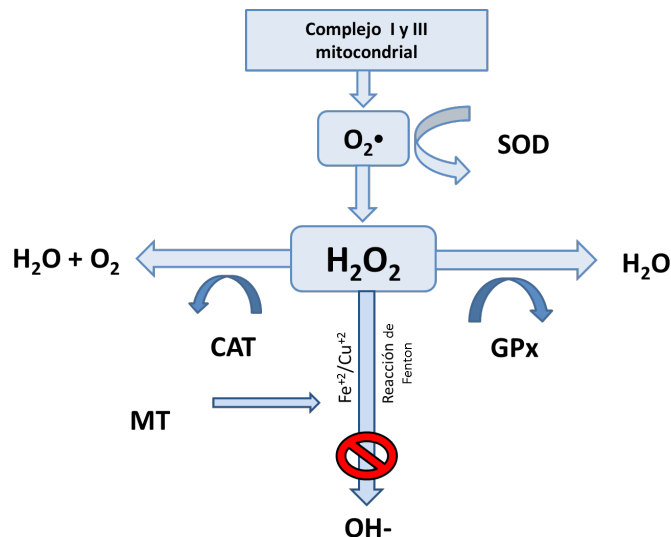
### b) Sistemas antioxidantes

La producción fisiológica de EROs en organismos aeróbicos requiere la presencia de un sistema de defensa contra los efectos de estas especies oxidativas. Los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo inducido por RL implican: (i) mecanismos preventivos, (ii) mecanismos de reparación, (iii) defensas físicas y (iv) defensas antioxidantes<sup>38</sup>. Entre las principales defensas antioxidantes se encuentran la Super Óxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y Glutatió Peróxidasa (GSH-Px) como antioxidantes enzimáticos<sup>38,51</sup>. Los antioxidantes no enzimáticos incluyen compuestos de bajo peso molecular, como vitaminas (vitaminas C y E),  $\beta$ -caroteno, ácido úrico y Glutatió (GSH, un tripéptido L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-L-glicina) que comprende un grupo tiol (sulfhidrilo)<sup>51</sup>. Las enzimas antioxidantes pueden remover catalíticamente las especies reactivas actuando de manera conjunta (Figura 1)



así mismo, las relaciones de SOD / CAT y SOD / GPx también pueden considerarse como índices de estrés oxidante<sup>52</sup>.

Figura 1. Principales vías por las que se contrarrestan los radicales libres



Nota: La SOD convierte el radical superóxido en peróxido de hidrogeno y este es convertido en agua por medio de la GPx o en agua y oxigeno por medio de la CAT. El peróxido de hidrogeno que no fue afectado por estas enzimas es convertido en radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton utilizando como cofactor iones de hierro. Este hierro puede ser quelado por las metalotioneínas interrumpiendo el proceso. SOD Superóxido Dismutasa; GPx Glutatión peroxidasa; CAT Catalasa; MT metalotioneínas.

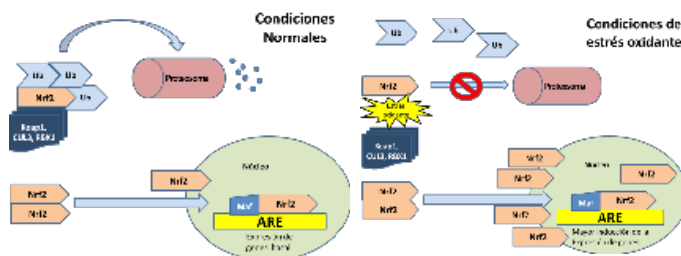
Las SOD convierten los radicales superóxido naturales en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno<sup>30,53</sup>; la catalasa usa peróxido de hidrógeno (una ROS no radical) como sustrato, siendo una de las enzimas antioxidantes más importantes ya que descompone dos moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en dos moléculas de agua y una de oxígeno en una reacción de dos pasos<sup>28</sup>; mientras que, la GPx cataliza la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hidroperóxidos orgánicos por Glutatión (GSH) u otros reductores biológicos<sup>54</sup>. La Metalotioneína (MT) en el sistema nervioso central ha mostrado su participación en diversos mecanismos celulares como proteger contra estrés oxidante, regulación de mecanismos homeostáticos del Zn, detoxificación de metales pesados y regulación de factores en procesos inflamatorios; el proceso de neuroinflamación es también un factor importante en enfermedades neurodegenerativas, ya que ellas incrementan la formación de EROs y ERN que pueden generar un mayor riesgo en el desarrollo de la enfermedad; en el cerebro, la desregulación de la homeostasis de metales esenciales está asociada con un número de enfermedades y neuropatologías, incluidas, apoplejía, epilepsia, Parkinson y Alzheimer<sup>55</sup>, así como actividad neurotrópica y neuroprotectora como resultado de sus propiedades antioxidantes<sup>56</sup>.

**c) Regulación de sistemas antioxidantes**

La inducción de enzimas citoprotectoras en respuesta al estrés oxidativo en el cerebro relativamente deficiente en sistemas antioxidantes, con una actividad menor de glutatión peroxidasa y catalasa en comparación con otros órganos es sumamente importante. La producción de estas enzimas está bajo el control del Nrf2, mediante un mecanismo regulado a nivel transcripcional, que conduce a la regulación del estado redox celular; diferentes informes sugieren que esta respuesta se expresa preferentemente en los astrocitos, con niveles considerablemente más bajos en las neuronas<sup>57</sup>.

El Nrf2 se une a la proteína Maf o las proteínas Jun para facilitar la unión de Nrf2 a los promotores (ARE) de genes citoprotectores y antioxidantes para aumentar la actividad de transcripción; en condiciones fisiológicas, Nrf2 se une a su molécula inhibidora citoplasmática conocida como proteína asociada Kelch 1 (Keap1) para permitir la ubiquitinación<sup>58</sup>. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo, la alternancia conformacional en los residuos de cisteína de Keap1 libera Nrf2 y proporciona la translocación de Nrf2 al núcleo para inducir la expresión de genes del sistema antioxidante (Figura 2).

Figura 2. Regulación de la expresión genética mediada por el Nrf2



En condiciones normales, el Nrf2 se encuentra unido y regulado por la proteína Keap1, posteriormente se une a la ubiquitina y es degradado por el complejo ubiquitin-proteosoma. En condiciones de estrés, la Keap1 sufre cambios conformacionales y se disocia del Nrf2, bloqueando la ubiquitinación y degradación del Nrf2, como consecuencia una mayor cantidad de Nrf2 es trasladado al núcleo en donde se une a ARE para inducir la expresión de genes.

La señalización dependiente de la proteína cinasa C (PKC) es un mecanismo alternativo para la regulación directa de la actividad de Nrf2 a través de la fosforilación de Ser40 y regular la actividad de Nrf2<sup>8</sup>; éste elemento regulador se considera que reconoce el estrés oxidativo celular y seguido de la unión al promotor de genes citoprotectores y antioxidantes mantiene un estado redox celular a través de la promoción de participantes con respuesta antioxidante (glutatión peroxidasa,

glutación reductasa, tioredoxina reductasa, ferritina, NADPH: quinona oxidoreductasa 1)<sup>8</sup>.

Se han identificado más de doscientos genes cuya expresión está regulada por la actividad transcripcional Nrf2; estos genes codifican proteínas involucradas en una multitud de funciones biológicas vitales que incluyen homeostasis de proteínas, respuesta al estrés oxidativo, desintoxicación, reparación del ADN, proliferación, autofagia, biogénesis y función mitocondrial, inflamación y el metabolismo de lípidos, carbohidratos y aminoácidos. El impacto de Nrf2 en el transcriptoma se amplifica por el hecho de que Nrf2 puede regular directamente o cruzarse bidireccionalmente con muchos otros factores de transcripción<sup>7</sup>.

## Estrés oxidativo y Epilepsia

### a) Mecanismos de acción

Las convulsiones se generan debido a descargas cerebrales paroxísticas hipersincrónicas anormales de las neuronas que eventualmente resulta en un daño irreversible a ellas y su entorno<sup>44</sup>. Dado que la muerte neuronal puede ser un factor importante que contribuye a la epileptogénesis, los mecanismos que influyen en la viabilidad neuronal también pueden desempeñar un papel en el proceso de la epileptogénesis; dichos mecanismos como el estrés oxidativo podrían contribuir de forma independiente a la progresión de la enfermedad, además de servir como procesos subyacentes a la lesión neuronal<sup>59</sup>. El estatus epiléptico aumenta las interacciones de las subunidades de los receptores de glutamato (NMDA, AMPA y metabotrópico), esto lleva a una entrada rápida de calcio; como consecuencia de esto, varias enzimas dependientes de calcio se activan de manera descontrolada, dando lugar a la activación de varias vías de señalización que generan daño mitocondrial, decremento en el ATP y un incremento en las ROS ocasionando oxidación de lípidos, proteínas y DNA causando muerte celular<sup>60</sup>. Además, el hipermetabolismo, la glucólisis, la alta producción de lactato puede causar acidosis láctica cerebral, lo que aumenta la producción de EROs y causa más daño debido a la disfunción mitocondrial<sup>61</sup>. El exceso de calcio y EROs conduce al deterioro del potencial de membrana mitocondrial, la activación de las enzimas de la matriz mitocondrial y la apertura de los poros de transición de permeabilidad mitocondrial, disminuyendo la producción de ATP; los EROs se producen principalmente en las mitocondrias a través de la actividad de la cadena de transporte de electrones como un subproducto de la fosforilación oxidativa<sup>44</sup>. Existe una creciente evidencia de un papel fundamental del estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas,

proporcionando nuevos objetivos para los tratamientos modificadores de la enfermedad. SE ha sugerido y probado antioxidantes para el tratamiento de la epilepsia<sup>62</sup>. El cerebro es particularmente vulnerable al daño oxidativo debido a su alta utilización de oxígeno, su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados oxidables y la presencia de metales con actividad redox (Cu, Fe). Las células neuronales son muy sensibles al estrés oxidativo; por lo tanto, la excitación prolongada de las neuronas durante las convulsiones puede conducir a lesiones resultantes de alteraciones bioquímicas y específicamente al papel que juega el estado de oxidación<sup>31</sup>. Evidencia reciente confirma que el estrés oxidativo se manifiesta como consecuencia del primer ataque convulsivo, que luego resulta ser la causa de la epileptogénesis<sup>44</sup>. Aunque ciertas epilepsias hereditarias se asocian con disfunción mitocondrial, se sabe poco acerca de su papel en las epilepsias adquiridas, como la epilepsia del ELT. El estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial son considerados como factores clave no solo son el resultado de las convulsiones, sino que también pueden contribuir a la epileptogénesis<sup>59</sup>.

La aparición de epilepsia aumenta con la edad, y el estrés oxidativo mitocondrial es un mecanismo principal del envejecimiento y la enfermedad degenerativa relacionada con la edad, lo que sugiere una mayor participación de la disfunción mitocondrial en la generación de convulsiones. Las mitocondrias tienen funciones celulares críticas que influyen en la excitabilidad neuronal, incluida la producción de trifosfato de adenosina (ATP), oxidación de ácidos grasos, control de la apoptosis y necrosis, regulación del ciclo de aminoácidos, biosíntesis de neurotransmisores y regulación de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> citosólico<sup>27</sup>.

El uso de modelos animales ha mostrado evidencia sobre los mecanismos que ocurren durante las convulsiones; por ejemplo, se ha demostrado que la administración sistémica con Ácido Kaínico (AK), análogo del glutamato, produce una serie de cambios de comportamiento que culminan con el estado epiléptico mostrando un patrón selectivo de cambios neuropatológicos similares a la ELT en humanos<sup>19, 63</sup>. Usando un modelo experimental de estatus epiléptico inducido eléctricamente, se ha demostrado que el estrés oxidativo ocurre tanto en neuronas como en astrocitos durante la epileptogénesis, según se evalúa midiendo marcadores bioquímicos e histológicos similares a lo encontrado en el hipocampo de humanos fallecidos a causa de un estado epiléptico<sup>64</sup>. La pérdida de neuronas inhibitorias en el hipocampo durante el estatus epiléptico puede alterar el estado estable de



excitación e inhibición entre poblaciones neuronales hacia la hiperexcitabilidad; esta hiperexcitabilidad inicia la gliosis reactiva dentro del hipocampo y la circunvolución dentada provocando cambios que conducirán a la neurodegeneración<sup>44</sup>.

### b) Papel del Nrf2

En años pasados, la investigación se ha enfocado constantemente en los mecanismos moleculares del proceso de la enfermedad, tales como aquellos que involucran al Nrf2, quien juega un papel importante en la regulación de los elementos de respuesta antioxidante y modulación del estado redox celular<sup>65</sup>. Algunos autores han reportado el papel neuroprotector que podría jugar el factor Nrf2 en la epilepsia; cuando se genera un aumento del estrés oxidativo celular por la sobreexcitación celular, los mecanismos de protección se incrementan por la inducción de enzimas citoprotectoras mediadas por este factor transcripcional en astrocitos y neuronas en cultivo con niveles elevados de Nrf2 así como de algunas enzimas antioxidantes<sup>4</sup>. Este aumento puede ser activado por mecanismos intracelulares como respuesta al daño oxidativo generado por las crisis epilépticas, proporcionando evidencia del papel neuroprotector del factor Nrf2 en el sistema nervioso central<sup>57</sup>.

Estudios recientes en humanos demostraron que la vía de señalización Nrf2-ARE podría representar un blanco importante para proteger al cerebro del daño inducido crisis epilépticas<sup>66</sup>. Por otro lado, estudios experimentales con ratones transgénicos tratados con kainato revelaron una activación selectiva de ARE dentro del hipocampo dañado. Además, los análisis de microarreglos que comparan el knockout de Nrf2 versus los hipocampos normales desenmascararon los cambios genéticos asociados con el movimiento de iones; los ratones knockout para Nrf2 son sensibles a la toxicidad del kainato, como revela la gravedad elevada de las convulsiones, la duración de las convulsiones, el daño neuronal del hipocampo y la mortalidad<sup>67</sup>. También se ha demostrado que en ratas Wistar las convulsiones inducen estrés oxidativo, la expresión de Nrf2, HO-1 y NQO1 a niveles de proteínas o genes existe un aumento en el hipocampo después de la convulsión. Según estos resultados, se podría postular que la vía de la señal Nrf2-ARE se activa en el hipocampo después de la convulsión<sup>68</sup>. Los genes se activan principalmente en los astrocitos, que en consecuencia tienen una desintoxicación más eficiente y mejores defensas antioxidantes que las neuronas, protegiéndose del estrés oxidativo<sup>69</sup>. Animales tratados con KA y PTZ, han mostrado un incremento en la expresión de Nrf2 con un aumento

evidente de la inmunorreactividad a las enzimas reguladas por este factor sugiriendo su activación en los modelos de crisis epilépticas<sup>4</sup>. Estudios similares reportaron un aumento en la expresión de Nrf2 en el cerebro de ratas tratado con ácido KA y PTZ<sup>57</sup>.

### Modelos experimentales de crisis epilépticas

Gran parte del conocimiento de la epilepsia se basa en el uso de modelos animales. Los modelos animales en el campo de la epilepsia son útiles para una variedad de tareas: la investigación de mecanismos fisiopatológicos, la evaluación y el desarrollo de un nuevo tratamiento antiepiléptico, y el estudio de las consecuencias de afecciones que pueden ser concurrentes con la epilepsia, consecuencias cognitivas y/o comorbilidades<sup>70</sup>. En consecuencia, se requiere el desarrollo de un modelo animal adecuado que imite las características clínicas<sup>17</sup>.

Se considera modelo de animal válido aquel que es capaz de reproducir total o parcialmente una serie de características clínicas, que luego se puedan trasladar al humano o a otras especies animales<sup>71</sup>. Sin embargo, ningún modelo animal individual presenta todas las características de TLE. En consecuencia, la selección del modelo animal apropiado debe basarse en el problema de investigación y debe reflejar una fisiopatología similar a la observada en el TLE humano. Algunos de estos modelos se basan en la administración sistémica de quimioconvulsivos para inducir una lesión precipitante inicial (estado epiléptico) seguida de la aparición de convulsiones recurrentes que se originan en las estructuras límbicas<sup>72</sup>; los modelos de estatus epiléptico apoyan la noción de que éste estado es capaz de inducir daño cerebral y contribuye a la epileptogénesis<sup>70</sup>.

#### a) Ácido Kaínico

El modelo de Ácido Kaínico (AK) de la ELT ha contribuido en gran medida a la comprensión de los mecanismos moleculares, celulares y farmacológicos subyacentes a la epileptogénesis y la ictogénesis; este modelo presenta características neuropatológicas y electroencefalográficas que se observan en pacientes con ELT<sup>73</sup>.

El AK es un análogo no degradable del glutamato y una potente neurotoxina; es una sustancia neuroexcitotóxica y epileptogénica que actúa sobre los receptores de kainato del sistema nervioso central. Los receptores de kainato son miembros de la familia de receptores de glutamato ionotrópicos que también incluyen los receptores de NMDA y AMPA<sup>74</sup>. La

causa de neurotoxicidad puede implicar aumentos en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intraneuronal y la activación de proteasas dependientes del  $\text{Ca}^{2+}$ ; al unirse a los receptores de kainato, el AK induce una serie de eventos celulares, que incluyen la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  celular, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la disfunción mitocondrial que conduce a la apoptosis y necrosis neuronal<sup>75</sup>. Las neuronas piramidales del hipocampo son particularmente vulnerables a las acciones neuroexcitatorias del KA debido a que activa los receptores ionotrópicos de glutamato, que inducen selectivamente la muerte celular excitotóxica en los subcampos del hipocampo CA3 y CA1 y dentro de la circunvolución dentada, lo que demuestra que la vulnerabilidad de las neuronas al estrés oxidativo varía de una región del cerebro a otra<sup>74</sup>.

Diversos estudios han reportado cambios de comportamiento, histopatológicos y neuroquímicos inducidos por la inyección sistémica AK. Los síntomas conductuales son de inicio rápido y de larga duración; así mismo, los cambios de comportamiento más pronunciados son una fuerte inmovilidad, una mayor incidencia de movimientos denominados "sacudidas de perro mojado" y convulsiones tónico-clónicas generalizadas de larga duración<sup>76</sup>. La administración sistémica de AK induce convulsiones límbicas agudas que se acompañan de daño cerebral (muerte neuronal en el hipocampo) que pueden derivar en convulsiones recurrentes espontáneas tardías<sup>77</sup>.

En el modelo de AK, el hipocampo y la amígdala son a menudo los sitios de origen de las convulsiones electrográficas, que luego se propagan al neocórtex. De hecho, las descargas ictales aparecen en la región CA3 del hipocampo y en la amígdala, y se propagan rápidamente al tálamo, la región CA1 y la corteza frontal<sup>19</sup>. El uso de administraciones sistémicas de AK induce un daño neuronal extenso en las estructuras hipocámpales y parahipocámpales; dentro de las 48 h posteriores a la inyección y principalmente en animales que mostraron fuertes convulsiones durante el estado epiléptico, hay una pérdida de células piramidales en las regiones CA1, CA3 y CA4 del hipocampo<sup>72</sup>. Este modelo también se caracteriza por un período de latencia que sigue a la lesión precipitante inicial (es decir, estado epiléptico) hasta la aparición de convulsiones recurrentes, como se observa en la condición humana<sup>73</sup>.

### b) Pentilentetrazol

El pentilentetrazol (PTZ) es un antagonista del receptor  $\text{GABA}_A$ ; una inyección intraperitoneal de PTZ en un animal induce una convulsión aguda y severa a una dosis alta, mientras que las inyecciones secuenciales de una dosis subconvulsiva se han utilizado para el desarrollo de kindling químico, esto sucede

cuando se inyecta una sola dosis baja de PTZ, induciendo una convulsión leve. Sin embargo, las inyecciones repetidas de dosis bajas de PTZ disminuyen el umbral para provocar un ataque convulsivo y finalmente, la administración continua de dosis bajas de PTZ produce una convulsión tónico-clónica grave<sup>78</sup>.

Las convulsiones repetidas inducidas por PTZ alteran la inhibición mediada por GABA y la excitación mediada por glutamato, lo que puede contribuir a una mayor susceptibilidad a las convulsiones; uno de los mecanismos subyacentes a la epilepsia producida por PTZ es el aumento de voltaje en el canal de potasio dependiente de voltaje. Específicamente, PTZ bloquea el receptor  $\text{GABA}_A$  y tanto  $\text{GABA}_A$  como  $\text{GABA}_B$  están involucrados en el control de la excitabilidad neuronal y la epileptogénesis. Las inyecciones repetidas de PTZ pueden provocar pérdida neuronal selectiva con atrofia hipocámpal y gliosis, que podrían ser el resultado de una mayor actividad de los sistemas glutamatérgicos<sup>79</sup>. Las convulsiones inducidas por PTZ aumentan gradualmente en intensidad identificando once categorías de comportamiento y se ha encontrado que seis categorías diferentes de intensidad de las convulsiones difieren entre sí en función de las diferencias en las latencias de inicio, el patrón de aparición durante dosis altas o bajas de PTZ y el patrón de electroencefalograma<sup>80</sup>.

La coadministración de pilocarpina y PTZ ha demostrado inducir convulsiones, que tiene una similitud de comportamiento entre el kindling eléctrico y químico. La dosis adecuada para la inducción de kindling es de 50 mg / kg y 37.5mg/ kg de pilocarpina y PTZ respectivamente. Los animales con esta dosis alcanzan la etapa cinco de convulsiones significativamente más rápido que aquellos sólo con PTZ<sup>81</sup>.

### c) Pilocarpina

La pilocarpina es un alcaloide natural,  $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ , que se obtiene de las hojas de los arbustos sudamericanos del género *Pilocarpus*, específicamente de los folíolos de *Pilocarpus jaborandi* o *Pilocarpus microphyllus*<sup>82</sup>. La inyección de pilocarpina induce un estatus epiléptico que se caracteriza por convulsiones generalizadas tónico-clónicas que caracterizan la condición epiléptica crónica<sup>83</sup>. La administración sistémica de un potente agonista muscarínico como la pilocarpina en ratas promueve cambios secuenciales de comportamiento y electrográficos que pueden dividirse en 3 períodos distintos: (a) un período agudo que se acumula progresivamente en un estado epiléptico límbico y que dura 24 h, (b) un período de silencio con una normalización progresiva del electroencefalograma y el comportamiento

que varía de 4 a 44 días, y (c) un período crónico con convulsiones recurrentes espontáneas<sup>84</sup>. La evidencia experimental ha demostrado que la acción de la pilocarpina a través del subtipo de receptor muscarínico M1, causa un desequilibrio entre la transmisión excitadora e inhibitoria, dando como resultado la generación de estatus epiléptico. Asociado con esto, una elevación en los niveles de glutamato en el hipocampo mantuvo las convulsiones por activación del receptor NMDA<sup>85</sup>. Se ha demostrado recientemente que después de una inyección intraperitoneal de pilocarpina y del monitoreo de las convulsiones crónicas recurrentes en animales, se presentan cambios de comportamiento con una correlación con la pérdida neuronal del hipocampo a los 7 días y 6 semanas después de la pilocarpina<sup>85</sup>. El modelo de epilepsia de pilocarpina puede estar mediado por aumentos en el estrés oxidativo, que podría tener un papel en la neurodegeneración del hipocampo.

Se han establecido variaciones del modelo de pilocarpina combinando este convulsivo con otros fármacos, como el litio. El litio generalmente se administra 24 h antes de la inducción de SE y permite una reducción notoria de la dosis de pilocarpina necesaria para inducir convulsiones (30 mg / kg). La secuencia de cambios de comportamiento observados en animales sometidos a una EE fue muy similar para la pilocarpina de litio en comparación con la pilocarpina administrada sola<sup>83</sup>.

## Conclusión

En años recientes ha habido grandes avances en cuanto al entendimiento de los eventos que generan epilepsia, el estrés oxidante sigue siendo uno de los factores de mayor importancia e impacto en esta enfermedad. Los modelos animales con los que se cuenta para estudiar y entender estos fenómenos han permitido dilucidar en gran medida las consecuencias biológicas del estrés oxidante en la enfermedad. Asimismo, los modelos animales también han contribuido al entendimiento de los sistemas de protección celular que participan en la regulación de EROs. Uno de los elementos que juegan un papel central en la protección contra agentes oxidantes es el factor de transcripción Nrf2, sin embargo, no ha sido estudiado completamente y debido a su importancia en la regulación antioxidante, podría ser de utilidad como blanco para una terapia farmacológica en las epilepsias farmacorresistentes. Por lo tanto, es necesario encaminar los esfuerzos para entender de una mejor manera el papel de este factor de transcripción en los eventos que conllevan a las crisis epilépticas.

## Referencias

- Ruiz-Diaz A, Manjarrez J, Nava-Ruiz C, et al. Expression of Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor 2 in Rat Brain Following the Administration of Kainic Acid and Pentylentetrazole. *Neuroreport*. 2019;30(5):358-62. doi: 10.1097/WNR.0000000000001207
- Galanopoulou AS, Buckmaster PS, Staley KJ, Moshé SL, et al. Identification of New Epilepsy Treatments: Issues in Preclinical Methodology. *Epilepsia*. 2012; 53(3):571-82. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03391.x.
- Sander JW. The Epidemiology of Epilepsy Revisited. *Curr Opin Neurol*. 2003;16(2):165-70. doi: 10.1097/01.wco.0000063766.15877.8e.
- Munguia-Martinez MF, Nava-Ruiz C, Ruiz-Diaz A, Diaz-Ruiz A, Yescas-Gomez P, Mendez-Armenta M. Immunohistochemical Study of Antioxidant Enzymes Regulated by Nrf2 in the Models of Epileptic Seizures (KA and PTZ). *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:1327986. doi: 10.1155/2019/1327986.
- Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, et al. Operational Classification of Seizure Types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):522-30. DOI: 10.1111/epi.13670
- Penfield W, Erickson TC. *Epilepsy and Cerebral Localization a study of the mechanism, treatment and prevention of epileptic seizures*. Oxford, England: Charles C. Thomas; 1941. Springfield, 623p.
- Galie M, Covi V, Tabaracci G, Malatesta M. The Role of Nrf2 in the Antioxidant Cellular Response to Medical Ozone Exposure. *Int J Mol Sci*. 2019;20(16). doi: 10.3390/ijms20164009
- Kahroba H, Shirmohamadi M, Hejazi MS, Samadi N. The Role of Nrf2 signaling in cancer stem cells: From stemness and self-renewal to tumorigenesis and chemoresistance. *Life Sci*. 2019;239:116986. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116986
- Behr C, Goltzene MA, Kosmalski G, Hirsch E, Ryvlin P. Epidemiology of epilepsy. *Rev Neurol (Paris)*. 2016; 172(1):27-36. doi:10.1016/j.neurol.2015.11.003
- Escobar A BB, Vega GJG, Weidenheim KM. Displasia cortical focal y epilepsia. *Revista Mexicana de Neurociencias*. 2008;9(3).
- Beghi E, Giussani G, Sander JW. The natural history and prognosis of epilepsy. *Epileptic Disord*. 2015;17(3):243-53. doi: 10.1684/epd.2015.0751
- Henshall DC, Simon RP. Epilepsy and apoptosis pathways. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25(12):1557-72. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600149
- Faingold CL. The role of the brain stem in generalized epileptic seizures. *Metab Brain Dis*. 1987;2(2):81-112. doi: 10.1007/BF00999720
- Pack AM. *Epilepsy Overview and Revised Classification of Seizures and Epilepsies*. Continuum (Minneapolis, Minn). 2019;25(2):306-21. doi: 10.1212/CON.0000000000000707
- Beghi E, Sander JW. The ILAE classification of seizures and epilepsies: implications for the clinic. *Expert Rev Neurother*. 2018;18(3):179-83. doi: 10.1080/14737175.2018.1427066
- Blauwblomme T, Jiruska P, Huberfeld G. Mechanisms of Ictogenesis. *Int Rev Neurobiol*. 2014;114C:155-85. doi: 10.1016/B978-0-12-418693-4.00007-8
- Nirwan N, Vyas P, Vohora D. Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy: a narrative review. *Rev Neurosci*. 2018;29(7):757-70. doi: 10.1515/revneuro-2017-0086
- Bernard C, Cossart R., Ben-Ari Y., Cossart R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci*. 23, 580-587. *Trends in neurosciences*. 2000;23:580-7. doi: 10.1016/s0166-2236(00)01659-3

19. Rubio C, Rubio-Osornio M, Retana-Márquez S, López M, Custodio V, Paz C. In Vivo Experimental Models of Epilepsy. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 2010;10(4):298-309. doi: 10.2174/187152410793429746
20. Miyata H. Surgical Pathology of Adulthood Epilepsy. *Brain Nerve.* 2017;69(10):1091-104. doi: 10.11477/mf.1416200876
21. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. *Lancet.* 2019;393(10172):689-701.
22. Łukawski K, Andres-Mach M, Czuczwar M, Łuszczki JJ, Kruszyłski K, Czuczwar SJ. Mechanisms of epileptogenesis and preclinical approach to antiepileptogenic therapies. *Pharmacol Rep.* 2018;70(2):284-93. doi: 10.1016/j.pharep.2017.07.012
23. Engelborghs S, D'Hooge R, De Deyn PP. Pathophysiology of epilepsy. *Acta Neurol Belg.* 2000;100(4):201-13. PMID: 11233674.
24. Staley K. Molecular mechanisms of epilepsy. *Nat Neurosci.* 2015;18(3):367-72. doi: 10.1038/nn.3947
25. Moreno-Jiménez S, Avilez A, Alonso Vanegas M. Bioquímica de la epilepsia y modelos experimentales de epilepsia. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas.* 2004;9:15-20. [www.redalyc.org/articulo.oa?id=47390310](http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=47390310)
26. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 5ed. Oxford: Oxford University Press; 2015. 944 p. doi:10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001
27. Waldbaum S, Patel M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2010;88(1):23-45. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2009.09.020
28. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;1-19. doi: 10.1155/2019/9613090
29. Holley AK, Dhar SK, Xu Y, St Clair DK. Manganese superoxide dismutase: beyond life and death. *Amino Acids.* 2012;42(1):139-58 doi:10.1007/s00726-010-0600-9.
30. Filograna R, Godena VK, Sanchez-Martinez A, et al. Superoxide Dismutase (SOD)-mimetic M40403 Is Protective in Cell and Fly Models of Paraquat Toxicity: IMPLICATIONS FOR PARKINSON DISEASE. *J Biol Chem.* 2016;291(17):9257-67. doi: 10.1074/jbc.M115.708057
31. Méndez-Armenta M, Nava-Ruiz C, Juárez-Rebollar D, Rodríguez-Martínez E, Yescas Gómez P. Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy. *Oxid Med Cell Longev.* 2014. doi: 10.1155/2014/293689
32. Tharmalingam S, Alhasawi A, Appanna VP, Lemire J, Appanna VD. Reactive nitrogen species (RNS)-resistant microbes: adaptation and medical implications. *Biol Chem.* 2017;398(11):1193-208. doi: 10.1515/hsz-2017-0152
33. Olloquequi J, Cornejo-Córdova E, Verdaguer E, Soriano FX, Binvignat O, Auladell C, Camins A. Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders: Therapeutic implications. *J Psychopharmacol.* 2018;32(3):265-75. doi: 10.1177/0269881118754680
34. Smallwood MJ, Nissim A, Knight AR, Whiteman M, Haigh R, Winyard PG. Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. *Free Radic Biol Med.* 2018;125:3-14. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.086
35. Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules.* 2019;24(8). doi: 10.3390/molecules24081583
36. Winkhofer KF, Haass C. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(1):29-44. doi: 10.1016/j.bbdis.2009.08.013
37. Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu ZB. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med.* 2019;44(1):3-15. doi: 10.3892/ijmm.2019.4188
38. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
39. Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA, Ganje AS. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother.* 2015;74:101-10. doi: 10.1016/j.biopha.2015.07.025
40. Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 2014;115:157-88. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.11.006
41. Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med.* 2000;78(1):3-13. doi: 10.1007/s001090000077
42. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium.* 2003;34(4-5):325-37. doi: 10.1016/s0143-4160(03)00141-6
43. Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 2009;30(4):379-87. doi: 10.1038/aps.2009.24
44. Puttachary S, Sharma S, Stark S, Thippeswamy T. Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *BioMed research international.* 2015;2015:745613. doi: 10.1155/2015/745613
45. Chuang YC. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in seizure-induced neuronal cell death. *Acta Neurol Taiwan.* 2010;19(1):3-15. PMID: 20711885
46. Henshall DC. Apoptosis signalling pathways in seizure-induced neuronal death and epilepsy. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 2):421-3. doi: 10.1042/BST0350421
47. D'Orsi B, Mateyka J, Prehn JHM. Control of mitochondrial physiology and cell death by the Bcl-2 family proteins Bax and Bok. *Neurochem Int.* 2017;109:162-70. doi: 10.1016/j.neuint.2017.03.010
48. Jafarian M, Modarres Mousavi SM, Alipour F, Aligholi H, Noorbakhsh F, Ghadipasha M, Gharehdaghi J, Kellinghaus C, Kovac S, Ghadiri MK, Meuth SG, Speckmann EJ, Stummer W, Gorji A. Cell injury and receptor expression in the epileptic human amygdala. *Neurobiol Dis.* 2019;124:416-27. doi: 10.1016/j.nbd.2018.12.017
49. Xu LL, Wu YF, Wang L, Li CC, Li L, Di B, et al. Structure-activity and structure-property relationships of novel Nrf2 activators with a 1,2,4-oxadiazole core and their therapeutic effects on acetaminophen (APAP)-induced acute liver injury. *Eur J Med Chem.* 2018;157:1376-94. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.08.071
50. Chen QM, Maltagliati AJ. Nrf2 at the heart of oxidative stress and cardiac protection. *Physiol Genomics.* 2018;50(2):77-97. doi: 10.1152/physiolgenomics.00041.2017
51. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9-19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613
52. Formigari A, Irato P, Santon A. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* 2007;146(4):443-59. doi: 10.1016/j.cbpc.2007.07.010
53. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(7):1957-97. doi: 10.1089/ars.2010.3586
54. Cardoso BR, Hare DJ, Bush AI, Roberts BR. Glutathione peroxidase 4: a new player in neurodegeneration? *Mol Psychiatry.* 2017;22(3):328-35. doi: 10.1038/mp.2016.196

55. Asmussen JW, Ambjorn M, Bock E, Berezin V. Peptides modeled after the alpha-domain of metallothionein induce neurite outgrowth and promote survival of cerebellar granule neurons. *Eur J Cell Biol.* 2009;88(8):433-43. doi: 10.1016/j.ejcb.2009.04.001
56. Santos CR, Martinho A, Quintela T, Goncalves I. Neuroprotective and neuroregenerative properties of metallothioneins. *IUBMB Life.* 2012;64(2):126-35. doi: 10.1002/iub.585
57. Ruíz-Díaz A, Manjarrez J, Nava-Ruiz C, Zaga-Clavellina V, Flores-Espinosa P, Díaz-Ruiz A, et al. Expression of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 in rat brain following the administration of kainic acid and pentylentetrazole. *Neuroreport.* 2019;30(5):358-62. doi: 10.1097/WNR.0000000000001207
58. Tebay LE, Robertson H, Durant ST, Vitale SR, Penning TM, Dinkova-Kostova AT, Hayes JD. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radic Biol Med.* 2015;88(Pt B):108-46. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.021
59. Patel M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radical Biology and Medicine.* 2004;37(12):1951-62. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.021
60. Chen S-D, Yw Chang A, Chuang Y-C. The potential role of mitochondrial dysfunction in seizure-associated cell death in the hippocampus and epileptogenesis. *J Bioenerg Biomembr.* 2010;42(6):461-5. doi: 10.1007/s10863-010-9321-8
61. Liang L-P, Patel M. Seizure-induced changes in mitochondrial redox status. *Free Radical Biology and Medicine.* 2006;40(2):316-22. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.026
62. Shekh-Ahmad T, Kovac S, Abramov AY, Walker MC. Reactive oxygen species in status epilepticus. *Epilepsy Behav.* 2019;101(Pt B):106410. doi: 10.1016/j.yebeh.2019.07.011
63. Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure.* 2011;20(5):359-68. doi: 10.1016/j.seizure.2011.01.003
64. Pauletti A, Terrone G, Shekh-Ahmad T, Salamone A, Ravizza T, Rizzi M, et al. Targeting oxidative stress improves disease outcomes in a rat model of acquired epilepsy. *Brain.* 2019;142(7):e39-e. doi: 10.1093/brain/awz130
65. Carmona-Aparicio L, Pérez-Cruz C, Zavala-Tecuapetla C, Granados-Rojas L, Rivera-Espinosa L, Montesinos-Correa H, et al. Overview of Nrf2 as Therapeutic Target in Epilepsy. *Int J Mol Sci.* 2015;16(8):18348-67. doi: 10.3390/ijms160818348
66. Mazzuferi M, Kumar G, van Eyll J, Danis B, Foerch P, Kaminski RM. Nrf2 defense pathway: Experimental evidence for its protective role in epilepsy. *Ann Neurol.* 2013;74(4):560-8. doi: 10.1002/ana.23940
67. Kraft AD, Lee J-M, Johnson DA, Kan YW, Johnson JA. Neuronal sensitivity to kainic acid is dependent on the Nrf2-mediated actions of the antioxidant response element. *J Neurochem.* 2006;98(6):1852-65. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04019.x
68. Wang W, Wang WP, Zhang GL, Wu YF, Xie T, Kan MC, et al. Activation of Nrf2-ARE signal pathway in hippocampus of amygdala kindling rats. *Neurosci Lett.* 2013;543:58-63.
69. Habas A, Hahn J, Wang X, Margeta M. Neuronal activity regulates astrocytic Nrf2 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(45):18291-6. doi: 10.1016/j.neulet.2013.03.038
70. Auvin S, Dupuis N. Outcome of status epilepticus. What do we learn from animal data? *Epileptic Disord.* 2014;16 Spec No 1:537-43. doi: 10.1684/epd.2014.0670
71. Garcia-Garcia ME, Garcia-Morales I, Matías-Guiu J. Modelos experimentales en epilepsia. *Neurología.* 2010;25(3):181-8. PMID: 20492865
72. Lévesque M, Avoli M, Bernard C. Animal models of temporal lobe epilepsy following systemic chemoconvulsant administration. *J Neurosci Methods.* 2016;260:45-52. doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.03.009
73. Lévesque M, Avoli M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013;37(10 Pt 2):2887-99. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.10.011
74. Szaroma W, Dziubek K, Gren A, Kreczmer B, Kapusta E. Influence of the kainic acid on antioxidant status in the brain, liver and kidneys of the mouse. *Acta Physiol Hung.* 2012;99(4):447-59. doi: 10.1556/APhysiol.99.2012.4.9
75. Coyle JT. Kainic acid: insights into excitatory mechanisms causing selective neuronal degeneration. *Ciba Found Symp.* 1987;126:186-203. doi: 10.1002/9780470513422.ch12
76. Sperk G, Lassmann H, Baran H, Kish SJ, Seitelberger F, Hornykiewicz O. Kainic acid induced seizures: Neurochemical and histopathological changes. *Neuroscience.* 1983;10(4):1301-15. doi: 10.1016/0306-4522(83)90113-6
77. Schwarzer C, Tsunashima K, Wanzenböck C, Fuchs K, Sieghart W, Sperk G. GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus II: altered distribution in kainic acid-induced temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* 1997;80(4):1001-17. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00145-0
78. Shimada T, Yamagata K. Pentylentetrazole-Induced Kindling Mouse Model. *J Vis Exp.* 2018(136). doi: 10.3791/56573
79. Samokhina E, Samokhin A. Neuropathological profile of the pentylentetrazol (PTZ) kindling model. *Int J Neurosci.* 2018;128(11):1086-96. doi: 10.1080/00207454.2018.1481064
80. Lüttjohann A, Fabene PF, van Luijckelaar G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav.* 2009;98(5):579-86. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.09.005
81. Mousavi-Hasanzadeh M, Rezaeian-Varmaziar H, Shafaat O, Jand A, Palizvan MR. The effect of co-administration of pentylentetrazole with pilocarpine: New modified PTZ models of kindling and seizure. *Pharmacol Biochem Behav.* 2019;182:7-11. doi: 10.1016/j.pbb.2019.04.010
82. Zimmerman TJ. Pilocarpine. *Ophthalmology.* 1981;88(1):85-8. doi: 10.1016/s0161-6420(81)35072-6
83. Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods.* 2008;172(2):143-57. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.04.019
84. Scorza FA, Arida RM, Naffah-Mazzacoratti Mda G, Scerni DA, Calderazzo L, Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *An Acad Bras Cienc.* 2009;81(3):345-65. doi: 10.1590/s0001-37652009000300003
85. Kim JE, Cho KO. The Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy and EEG Monitoring Using Radiotelemetry System in Mice. *J Vis Exp.* 2018(132). doi: 10.3791/56831

---

Artículo sin conflicto de interés

© Archivos de Neurociencias