

# Efectos protectores del uso de *Buxus hyrcana* contra el deterioro de la memoria y el estrés oxidativo en un modelo de epilepsia inducida con pentilentetrazol en rata

Azizi Vahid  | Allahyari Farzin  | Hosseini Abdolkarim  

Departamento de Ciencias Animales y Biología Marina, Facultad de Ciencias de la Vida y Biotecnología, Universidad Shahid Beheshti, Teherán, Irán.

## Correspondencia

Abdolkarim Hosseini  
Departamento de Ciencias Animales y Biología Marina, Facultad de Ciencias de la Vida y Biotecnología, Universidad Shahid Beheshti, Teherán, Irán.

✉ [ab\\_hosseini@sbu.ac.ir](mailto:ab_hosseini@sbu.ac.ir)

## Resumen

El pentilentetrazol (PTZ) es una sustancia química utilizada ampliamente para la inducción de convulsiones y epilepsia en el modelo animal; altera el equilibrio entre los radicales libres y causa estrés oxidativo en el cuerpo con un impacto negativo en la memoria y aprendizaje. En este estudio se la planta medicinal *Buxus hyrcana* fue empleada para evaluar su efecto sobre el estrés oxidativo y el déficit de memoria causado por PTZ en ratas. Veinticuatro ratas fueron aleatoriamente distribuidas en cuatro grupos: control negativo bajo tratamiento con PTZ (dosis subumbral 35 mg/kg durante un mes), control positivo bajo tratamiento con fenobarbital (PB-30 mg/kg) y dos grupos PTZ en tratamiento con extracto de *B. hyrcana* (BHE-300 y -600 mg/kg). Se utilizó la prueba estándar de evitación pasiva para evaluar retención y recuerdo (evaluación de memoria y aprendizaje). Después de la evaluación de comportamiento, las ratas fueron anestesiadas, y sus cerebros extraídos y homogeneizados; el estrés oxidativo se evaluó usando métodos específicos. La latencia de paso según la prueba de evitación pasiva fue mayor en el grupo receptor de BHE que en el grupo PTZ ( $p < 0,001$ ). Además, los niveles cerebrales de malondialdehído (MDA) y óxido nítrico (NO) en el grupo tratado con BHE fueron significativamente menores ( $p < 0,001$ ), y los niveles de glutatión reducido (GSH) significativamente mayores comparados con el grupo PTZ ( $p < 0,001$ ). Nuestros resultados mostraron que el BHE podría prevenir el déficit de memoria y mejorar el estrés oxidativo en las ratas inducidas por PTZ.

**Palabras clave:** *Buxus hyrcana*, epilepsia, estrés oxidativo, prueba de evitación pasiva, aprendizaje y memoria.

## Introducción

La convulsión es una afección en la que células nerviosas realizan descargas repentinas y simultáneas, a menudo acompañadas de cambios en la red y función neuronales. El término epilepsia se define como la presencia de dos o más convulsiones, y es una de las enfermedades más comunes en el mundo.<sup>1</sup> Junto con las convulsiones, la epilepsia también se asocia a otras comorbilidades, incluidos los déficits cognitivos, muy comunes en pacientes con epilepsia.<sup>2</sup> En la actualidad, la mayoría de los casos de epilepsia se tratan o controlan con fármacos antiepilépticos (FAE), los cuales, como se ha informado, tienen limitaciones en cuanto a rendimiento, seguridad y eficacia.<sup>3</sup> Aunque hay muchos estudios sobre cómo se desarrollan las comorbilidades en pacientes con epilepsia, hay poca información sobre cómo las crisis epilépticas provocan un deterioro de la memoria asociado con el aprendizaje.<sup>4</sup>

El estrés oxidativo y los radicales libres se encuentran entre los mecanismos más importantes que pueden contribuir a trastornos como las crisis epilépticas.<sup>5</sup> Las crisis epilépticas también se han relacionado con el aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ) en el cerebro.<sup>6</sup> El estrés oxidativo es la consecuencia de una desproporción entre la estructura de resistencia antioxidante y la formación de ROS,<sup>7</sup> lo cual daña las membranas celulares y el ADN, produciendo deterioro y muerte celular, así como enfermedades crónicas como Alzheimer, cáncer, epilepsia, Parkinson y enfermedades cardíacas.<sup>8,9</sup> El papel del estrés oxidativo en la epilepsia es bien conocido,<sup>10</sup> por lo que mantener niveles bajos de ROS es crucial para una función celular normal. Los aumentos a largo plazo de ROS representan un riesgo inherente de mayor daño neurológico, como se observa en la epilepsia.<sup>11</sup> Además, se ha informado que el óxido nítrico (NO) constituye un potencial neurotransmisor



o mensajero retrógrado relacionado con la plasticidad sináptica, la regulación de la excitabilidad cerebral, y la activación de la actividad convulsiva. Sin embargo, también ha sido ampliamente implicado en numerosas enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas debido a sus acciones prooxidantes y antioxidantes.<sup>12</sup>

Actualmente, fármacos antiepilépticos (FAE) como los barbitúricos y una variedad de sedantes son empleados para prevenir o tratar la epilepsia. Aunque en los últimos años se han introducido diversos fármacos para el tratamiento de la epilepsia, estos continúan mostrando efectos adversos e incluso nocivos que, en la mayoría de los casos, incluso con dosis adecuadas, no logran evitar efectivamente las convulsiones. Como consecuencia, estos pueden tener un gran impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes, tanto psicológica como conductualmente.<sup>13,14</sup> Uno de los enfoques comunes en el descubrimiento y desarrollo de los FAE —fundamental para la curación de personas enfermas con convulsiones y epilepsia— es el empleo de sustancias naturales con propiedades medicinales.<sup>15</sup> Una de las hierbas que ha demostrado propiedades medicinales benéficas y ha sido estudiada en la medicina tradicional es la *Buxus hyrcana* (familia Buxaceae), que crece en varias partes del mundo.<sup>16,17</sup> La investigación fitoquímica reciente sobre *Buxus hyrcana* Pojark ha dado como resultado el aislamiento de alcaloides triterpenos, incluidos el hyrcanone, hyrcanol, hyrcatrienine, N(b)-dimethylcyclobuxoviricine e hyrcamine, a través de métodos espectroscópicos modernos; mientras que los alcaloides conocidos como buxidín, buxandrine, buxabenzacínine, buxippine- K, y E-buxenona fueron identificados y reportados anteriormente.<sup>17</sup> Estudios previos han demostrado las múltiples propiedades medicinales de la *B. hyrcana*, como su actividad antimalárica, anticancerígena, inmunosupresora —debida a sus principios activos— antifúngica y antileishmanial; además, tiene características antiinflamatorias y antioxidantes por sus compuestos triterpenoides y alcaloides.<sup>16-21</sup> Adicionalmente, sus propiedades anticonvulsivas y neuroprotectoras han sido recientemente documentadas en modelos animales de experimentación.<sup>22</sup>

Dado el trastorno de las manifestaciones conductuales asociado con la epilepsia y los efectos de la *B. hyrcana* en dichos trastornos, se planteó la hipótesis de que el extracto de *B. hyrcana* (BHE) tendría un efecto positivo en el aprendizaje y la memoria en ratas expuestas a pentilentetrazol (PTZ). El objetivo de este experimento fue evaluar los efectos

de la BHE en los trastornos del comportamiento (es decir, aprendizaje y memoria) causados por epilepsia y convulsiones en ratas macho adultas.

## Materiales y métodos

### Ética animal

Este experimento se realizó en la Universidad Shahid Beheshti (Teherán, Irán) en ratas Wistar adultas ( $200 \pm 20$  g, 8 semanas de edad) obtenidas de la Universidad de Ciencias Médicas Shahid Beheshti (Teherán, Irán). Los animales se mantuvieron durante una semana en una habitación con condiciones constantes (12 h de luz/oscuridad con iluminación a partir de las 7 a.m.,  $22 \pm 2$  °C,  $55 \pm 5\%$  de humedad relativa) en jaulas estándar de policarbonato, para que pudieran adaptarse a un nuevo entorno. Los animales tuvieron libre acceso a agua y alimento especial para ratas (Pars Animal Feed, Irán) durante todo el experimento. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos experimentales (cada uno con 6 ratas) después de una semana de adaptación al entorno del laboratorio. Cada animal se usó solo una vez durante el ensayo y se hicieron esfuerzos para reducir el sufrimiento de los animales mientras se obtenían datos científicos confiables. Todos los experimentos se realizaron entre las 09:00 y las 15:00 h. La totalidad de los experimentos relacionados con derechos animales y conservación en este estudio se realizaron de acuerdo con las pautas éticas estándar (Directiva de las Comunidades Europeas 2010/63/UE) y fueron aprobados por el Comité de Ética Local de la Universidad Shahid Beheshti (código ético: IR.SBU.1397.156).

### Recolección de material vegetal y preparación de extractos

Las hierbas de *B. hyrcana* se obtuvieron del Instituto de Plantas Medicinales de la Universidad Shahid Beheshti. El extracto se preparó de acuerdo con las referencias citadas y trabajos previos.<sup>22</sup> Posteriormente, se preparó alrededor de 100 g de la parte aérea de la planta, se limpió, se secó a la sombra y se pulverizó mediante trituradora mecánica. Para preparar el extracto hidroalcohólico, el polvo vegetal se sumergió en un litro de etanol al 80% durante 72 h, luego la mezcla resultante se filtró y se concentró al vacío a 45°C utilizando un aparato rotatorio (EYEL A, Japón). El extracto resultante estaba seco en un 37,8 % y se almacenó en el refrigerador a 4°C hasta el experimento. La dosis requerida para la inyección intraperitoneal (i.p.) se basó en el peso del animal.

### Medicamentos y tratamientos

Se obtuvo pentilentetrazol de Sigma Company (EE.UU.), fenobarbital sódico (PB por sus siglas en inglés) de la Compañía Farmacéutica Chemidarou (Irán), y ketamina y xilazina de Alfasan Company (Países Bajos). El PTZ se preparó como una solución al 1% v/w en solución salina. Se utilizó fenobarbital sódico para establecer una comparación con un fármaco anticonvulsivo convencional. El fenobarbital sódico se disolvió en el suero fisiológico y se administró por vía intraperitoneal en una dosis de 30 mg kg<sup>-1</sup> por peso corporal del animal. El BHE se continuó en solución salina normal vía ip en dosis de 300 y 600 mg kg<sup>-1</sup> con PTZ durante el experimento hasta la inducción completa del animal. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos de seis: 1) grupo de control negativo (CN) que recibió solución salina normal (0,3 mL por rata), 2) grupo de control positivo (CP) que recibió PB (30 mg kg<sup>-1</sup>), grupos 3) y 4) que recibieron BHE (300 y 600 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente). Treinta minutos después de la inyección del vehículo, los animales PB y BHE (300 y 600 mg kg<sup>-1</sup>) fueron expuestos a la dosis subumbral de PTZ (35 mg kg<sup>-1</sup> por peso corporal). Todas las inyecciones se administraron en forma de soluciones frescas en un volumen constante de 0,3 mL por rata durante todo el estudio.<sup>22</sup>

### Prueba de inducción por pentilentetrazol

El estudio se realizó a modo de doble ciego (el experimentador no sabía qué animal pertenecía a qué grupo). Se inyectó pentilentetrazol en dosis subumbral de 35 mg kg<sup>-1</sup> cada 48 h durante un mes. Para registrar y valorar el comportamiento de las convulsiones, los animales se transfirieron individualmente a cajas de plástico transparente y se observaron inmediatamente después de la administración de PTZ durante una hora; de igual modo fueron grabados por una cámara conectada a una computadora. El umbral de convulsiones se midió en una escala de 6 pasos (Tabla 1). Los animales se consideraron inducidos si presentaban estadios en las escalas 4 o 5 en dos ensayos consecutivos. Los animales fueron expuestos a PTZ (70 mg kg<sup>-1</sup>) 7 días después del desarrollo de las convulsiones. Mientras tanto, fueron sometidos a la prueba de aprendizaje de evitación pasiva. La tasa de retención de la memoria se evaluó después de la exposición a PTZ.<sup>23</sup>

### Prueba de caja lanzadera

La caja lanzadera (Borj Sanat Azma, Irán) se utilizó para probar la memoria de evitación pasiva. El entrenamiento se llevó a cabo en la caja durante la fase de iluminación, entre las 08:00 y las 14:00 horas. La caja lanzadera consta de dos secciones oscuras y claras de idénticas dimensiones (27 cm × 14.5 cm × 14 cm) que se abren o cierran con una puerta de guillotina.

El suelo de ambos compartimentos está formado por varillas de acero separadas 1 cm entre sí. El suelo del compartimento oscuro puede ser electrificado por un estimulador. El proceso de prueba utilizado en este estudio se describió anteriormente.<sup>24</sup> En resumen, los animales en la fase de adquisición se colocaron inicialmente en la cámara de luz con la cara alejada de la puerta, y 10 s más tarde se retiró la puerta de guillotina. Las ratas tienen un interés innato en los ambientes oscuros. Cuando el animal entró por completo en la cámara oscura, se cerró la puerta de la guillotina y después de 30 s se sacó al animal de la cámara oscura y se colocó en su jaula. Este ensayo de habituación se repitió 30 minutos más tarde. Los animales no recibieron ningún shock durante estas etapas. Después de la segunda iteración, comenzó la primera prueba de adquisición. Se midió la latencia de paso de los animales durante la fase de adquisición (LPa) cuando entraron en los entornos oscuros con las cuatro patas. Una vez encerrado completamente el animal en la cámara oscura, se cerró la puerta de la guillotina y se aplicó al animal una descarga eléctrica moderada (1,5 mA) durante 3 s. Después de 20 s, el animal fue retirado de la cámara oscura y trasladado a su jaula. Luego de 5 min, se repitió la prueba. Las ratas recibieron una descarga cada vez que entraron por completo en el ambiente oscuro. El entrenamiento finalizó cuando el animal permaneció en la cámara de luz durante 120 segundos consecutivos. El número de choque (ND) en la prueba de adquisición se midió hasta completada la adquisición. La prueba de recuperación de memoria se realizó 24 h después de la adquisición. Las ratas se colocaron en la cámara de luz y la puerta de guillotina se retiró después de 30 s; la latencia de paso para ingresar a la cámara oscura durante la fase de recuperación (LPr), así como el tiempo total pasado en el compartimento de luz (TCL), se midieron hasta 300 s. Si las ratas no entraban en la cámara oscura durante 300s, la prueba concluía y se documentaba una puntuación de 300 para las ratas.

### Medición bioquímica

Después de la prueba de la caja lanzadera, las ratas fueron decapitadas rápidamente bajo anestesia profunda con ketamina y xilazina, y sus cerebros fueron extraídos, lavados con solución salina helada y mantenidos a -80°C para análisis posteriores.

### Evaluación del contenido de glutatión reducido (GSH) en el cerebro

Los niveles de GSH se evaluaron mediante el reactivo de Ellamn (ácido 5,50-ditio-bis-2-nitrobenzoico).<sup>25</sup>

### Medición de la actividad del malondialdehído (MDA) en el cerebro

Se utilizó el procedimiento de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) para evaluar el nivel de MDA en el cerebro.<sup>26</sup>

### Medición del nivel de óxido nítrico (NO) en el cerebro

El nivel indirecto de NO (nitritos y nitratos) en los tejidos cerebrales se calculó según el método de Griess. En resumen, los sobrenadantes se colocaron en un kit de 96 pocillos (kit de ensayo de óxido nítrico (NO) Natrix™, Novin Navand Salamat, Irán). La absorbancia de las muestras se leyó a 570 nm con lector Elisa (Biotech, San Jose, California, USA). La concentración de NO se evaluó mediante una curva estándar de nitrato.<sup>27</sup>

**Tabla 1.** Adaptación de la escala de Racine para convulsiones inducidas por pentilentetrazol (PTZ) en ratas.

| Etapas | Intensidad de las convulsiones                                         |
|--------|------------------------------------------------------------------------|
| 0      | Sin fluctuaciones de comportamiento                                    |
| 1      | Espasmos faciales y en orejas                                          |
| 2      | Cabeceo, clonus cefálico y espasmos mioclónicos                        |
| 3      | Clonus unilateral de miembro anterior con postura lordótica            |
| 4      | Clonus bilateral de miembro anterior con levantamiento y caída         |
| 5      | Crisis tónico-clónica generalizada (CTCG) con pérdida de tono postural |

### Análisis estadístico

Todas las evaluaciones estadísticas y gráficos se realizaron con el software GraphPad Prism (versión 8). Todas las pruebas de comportamiento y bioquímicas se interpretaron como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). La prueba de normalidad realizada mostró que la distribución de los datos es normal. Se realizó ANOVA de una vía para comparar las medias de las estadísticas. Se utilizó la prueba post hoc de Tukey cuando los datos fueron significativos para comparar los grupos por pares. El nivel de significación se consideró como  $P < 0,05$  para todos los grupos de estudio. Los tamaños del efecto se estimaron utilizando la estadística de eta parcial al cuadrado ( $\eta^2$ ).

## Resultados

### El efecto del BHE en las convulsiones en ratas inducidas por PTZ

El BHE produjo un aumento significativo en la media de latencia de los espasmos mioclónicos [ $F(3,20) = 15,65$ ,  $P < 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,75$ ] y una reducción en la media del número de espasmos mioclónicos [ $F(3,20) = 9,57$ ,  $P < 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,64$ ] en comparación con el grupo CN (Tabla 2). La evaluación post hoc mostró un aumento significativo ( $P = 0,002$ ) en la latencia media de los espasmos mioclónicos en el grupo de tratamiento con BHE en dosis de 600 mg

kg-1 en comparación con CN. Sin embargo, los grupos tratados con BHE en dosis de 300 no mostraron cambios significativos comparados con el grupo CN. Se observó una disminución significativa en la media del número de espasmos mioclónicos en dosis de 300 ( $P = 0,026$ ) y 600 ( $P = 0,002$ ) en los grupos tratados con BHE en contraste con CN (Tabla 2).

El ANOVA unidireccional mostró cambios significativos en la media de la latencia de las crisis tónico-clónicas generalizadas (CTCG) [ $F(3,20) = 12,21$ ,  $P < 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,70$ ], así como en la duración de las CTCG [ $F(3,20) = 58,80$ ,  $P < 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,92$ ] entre los grupos experimentales (Tabla 2). Un análisis posterior con la prueba de Tukey reveló que hubo un aumento significativo ( $P = 0,004$ ) en la latencia media de CTCG en el grupo BHE en una dosis de 600 en comparación con el grupo CN. No obstante, este aumento en la latencia media de CTCG en una dosis de 300 BHE no fue significativo comparado con el grupo CN (Tabla 2). En cuanto al parámetro de duración de CTCG, los grupos que recibieron BHE en dosis de 300 y 600 también mostraron una diferencia significativa en la disminución media en comparación con el grupo CN ( $P < 0,001$ , Tabla 2).

**Tabla 2.** Efecto de BHE sobre parámetros de comportamiento en convulsiones inducidas por PTZ en ratas.

| Tratamientos | Latencia de espasmos mioclónicos | Número de espasmos mioclónicos | Latencia de CTCG   | Duración de CTCG    |
|--------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------|---------------------|
| CN           | 36.80 $\pm$ 3.29                 | 14.40 $\pm$ 0.51               | 336.8 $\pm$ 5.32   | 22.82 $\pm$ 0.81    |
| PC           | 82.80 $\pm$ 4.47c                | 6.20 $\pm$ 1.02b               | 642.0 $\pm$ 51.34c | 8.70 $\pm$ 1.09c    |
| BHE 300      | 51.00 $\pm$ 8.28d                | 9.00 $\pm$ 2.05a               | 413.4 $\pm$ 23.46d | 14.53 $\pm$ 0.66c,d |
| BHE 600      | 70.40 $\pm$ 2.62b                | 7.00 $\pm$ 0.45b               | 572.0 $\pm$ 56.96b | 7.87 $\pm$ 0.97c,e  |

Los datos representan la media  $\pm$  SEM, a:  $P < 0,05$ , b:  $P < 0,01$ , c:  $P < 0,001$ , en comparación con el grupo de control negativo (CN); d:  $P < 0,01$ , en comparación con el grupo de control positivo (CP); e:  $P < 0,001$ , en comparación con el grupo BHE 300.

### Efecto de BHE en la memoria de evitación pasiva en la prueba de la caja lanzadera

Como se muestra en las Figuras 1(a,b), y confirmado por análisis de varianza, no hubo variaciones significativas entre los grupos experimentales con respecto a los índices LPA [ $F(3,20) = 0,99$ ,  $P = 0,423$ ,  $\eta^2 = 0,16$ ] y el ND en la prueba de adquisición [ $F(3,20) = 1,60$ ,  $P = 0,229$ ,  $\eta^2 = 0,23$ ]. En cuanto a los índices LPr [ $F(3,20) = 17,63$ ,  $P < 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,77$ ] y TLC [ $F(3,20) = 5,31$ ,  $P = 0,009$ ,  $\eta^2 = 0,50$ ], la ANOVA de una vía de la etapa de recuperación de memoria mostró un cambio significativo entre los grupos experimentales (Figura 1 (c, d)). La prueba post hoc de Tukey indicó que el grupo CP produjo un aumento significativo en la media de los índices LPr ( $P < 0,001$ ) y TLC ( $P = 0,018$ ) en comparación con el grupo CN (Figura 1 (c, d)). También hubo un aumento significativo en el grupo que recibió BHE

en dosis de 300 y 600 comparados con el grupo CN en LPr ( $P = 0,005$  y  $P < 0,001$ , respectivamente). En cuanto al parámetro TCL, solo la dosis de 600 BHE mostró un aumento significativo en comparación con el grupo CN ( $P = 0,015$ ).

## Efecto de BHE sobre los factores de estrés oxidativo

### Efecto de BHE en los niveles de GSH en el cerebro

Se experimentaron diferencias significativas en la media de los niveles de GSH en el cerebro de las ratas entre los diferentes grupos [ $F(3,20) = 73,18$ ,  $P < 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,93$ ]. El examen post hoc sugirió que la media del nivel de GSH aumentó significativamente en los grupos tratados con BHE en dosis de 600 en comparación con el grupo CN ( $P < 0,001$ ) (Figura 2 a). Por el contrario, los grupos tratados con BHE en dosis de 300 no mostraron cambios significativos comparados con el grupo CN (Figura 2a).

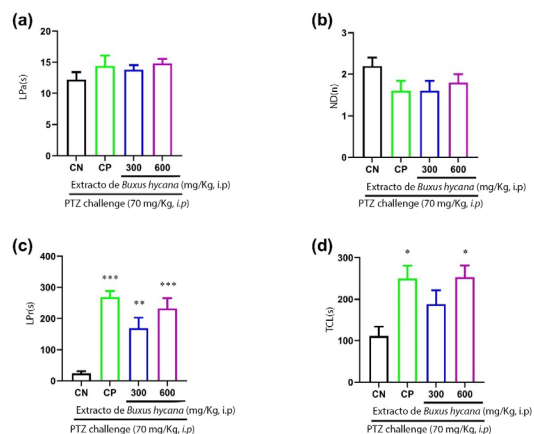
### El efecto de BHE en los niveles de MDA en el cerebro

Se observaron diferencias significativas en la media del nivel de MDA [ $F(3,20) = 82,65$ ,  $P < 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,94$ ] entre los grupos experimentales. La investigación post hoc sugirió que el nivel de MDA disminuyó significativamente en los grupos tratados con BHE en dosis de 300 y 600 comparados con el grupo CN ( $P < 0,001$ ) (Figura 2 b).

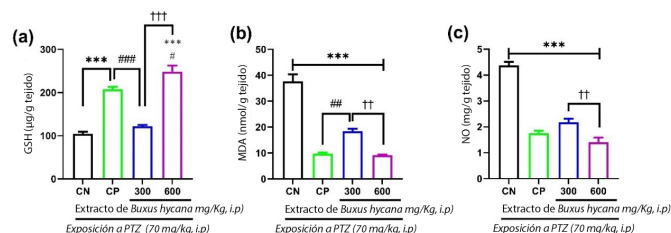
### El efecto de BHE en los niveles de NO en el cerebro

El análisis de varianza mostró un cambio significativo en el nivel medio de NO entre los diferentes grupos [ $F(3,20) = 89,25$ ,  $P < 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,94$ ]. El nivel de NO en el grupo BHE en dosis de 300 y 600 ( $P < 0,001$ ) fue significativamente menor que el del grupo CN (Figura 2 c).

**Figura 1.** Efecto de BHE sobre a) latencia de paso en la primera prueba de adquisición (LPA), b) número de descargas (ND) en la prueba de adquisición, c) latencia de paso en la prueba de retención (LPr), d) tiempo pasado en el compartimento de luz en la prueba de retención (TCL) de la tarea de aprendizaje de evitación pasiva (AEP) en convulsiones inducidas por PTZ en ratas. Cada columna y barra representan la media  $\pm$  SEM, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , en comparación con el grupo de control negativo (CN).



**Figura 2.** Efecto del BHE sobre a) niveles de GSH, (b) MDA y (c) NO en convulsiones inducidas por PTZ en ratas. Los datos representan la media  $\pm$  SEM, \*\*\*  $P < 0,001$ , comparada con el grupo de control negativo (CN); #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$ , con el grupo de control positivo (CP); ++  $P < 0,01$ , +++  $P < 0,001$ , y con el grupo BHE 300.



## Discusión

Este estudio identifica por primera vez el efecto positivo del BHE en el aprendizaje y la memoria de evitación pasiva en el modelo experimental de epilepsia inducida por PTZ. Los datos mostraron que el pretratamiento con BHE aumenta el umbral de convulsiones inducidas por PTZ. Además, nuestros hallazgos revelaron una disminución significativa en la manifestación epiléptica en ratas pretratadas con BHE. El BHE en dosis de 300 y 600 mg kg<sup>-1</sup> elevó significativamente el umbral de convulsiones y disminuyó la duración de CTCG en ratas inducidas en comparación con el grupo de control. En línea con este estudio, Azizi et al. (2018) observaron que la *B. hyrcana* exhibe características neuroprotectoras y anticonvulsivas en ratas Wistar en el modelo de convulsiones inducidas por PTZ. También han documentado que la dosis de 600 mg kg<sup>-1</sup> del extracto tiene el mayor efecto, lo que está en consonancia con nuestros resultados.<sup>22</sup>

En la investigación actual, se empleó la prueba de la caja lanzadera para evaluar las propiedades de retención y recuperación de la memoria. El resultado del estudio confirmó que las dosis de 300 y 600 mg kg<sup>-1</sup> de BHE aumentaron la LPr y la TCL en comparación con el grupo de control. Si bien hasta el momento no se han reportado estudios sobre el efecto de BHE en el deterioro de la memoria por agentes convulsivos, hay un informe sobre los efectos anticonvulsivos y neuroprotectores de la *B. hyrcana* en un modelo de convulsión aguda inducida por PTZ en rata. Este estudio muestra que la *B. hyrcana* tiene actividad protectora contra las convulsiones, lo que coincide con nuestros resultados.<sup>22</sup>

Examinamos la capacidad antioxidante de BHE, por lo que se evaluó el nivel cerebral total de GSH, MDA y NO. Como muestran los resultados, el BHE en dosis de 300 y 600 mg kg<sup>-1</sup> aumenta

significativamente el GSH y disminuye el nivel de MDA y NO, en comparación con el grupo PTZ. El pentilentetrazol también altera la barrera hematoencefálica y altera la función cerebral al crear radicales libres.<sup>28</sup> El cerebro es muy sensible al daño de los radicales libres, ya que contiene una gran cantidad de ácidos grasos y tiene una alta tasa de metabolismo oxidativo.<sup>29</sup> Los ROS están involucradas en la patogenia de varios tipos de enfermedades neurodegenerativas.<sup>30</sup> El estrés oxidativo puede desempeñar un papel importante en la generación de daño neurológico debido a convulsiones.<sup>31</sup> La administración prolongada de PTZ induce radicales libres y provoca actividad convulsiva en animales. El estrés oxidativo inducido por PTZ conduce a crisis tónico-clónicas y posterior muerte neurológica.<sup>32</sup> La inhibición de las neuronas cerebrales y la producción de radicales libres por PTZ es una de las principales causas de epilepsia en modelos experimentales de epilepsia. En la epilepsia, la actividad convulsiva siempre se acompaña de niveles amplificados de ROS.<sup>33</sup> Los estudios se han centrado en dilucidar si la actividad convulsiva prolongada en animales conduce a una mayor producción de ROS y si el daño oxidativo produce o no una lesión cerebral inducida por convulsiones. Este estudio es consistente con la teoría de que el estrés oxidativo en animales inducido por PTZ es probablemente uno de los parámetros implicados en la fisiopatología de la epilepsia.<sup>34</sup> Se considera que el NO juega un papel fundamental en la producción y propagación de la hiperactividad epileptiforme.<sup>12</sup> Diversos estudios proponen que el NO juega un papel clave en el progreso de la inducción<sup>12</sup> y, recientemente, se informó que el estrés oxidativo y nitrosativo son las principales marcas patológicas de varios trastornos neurodegenerativos, incluida la epilepsia.<sup>11,35</sup> Investigaciones recientes muestran que la hiperactivación de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), que puede ser causado por la sobreproducción de NO, produce estrés oxidativo debido a la generación de ROS.<sup>36</sup> El superóxido en las mitocondrias a veces se combina con NO para producir peroxinitrito, que se descompone liberando radicales hidroxilo, lo cual inicia el desarrollo de la peroxidación de lípidos y la descomposición de la formación de ADN que conduce al deterioro de las células neurales.<sup>37</sup>

Los flavonoides e isoflavonoides con actividad de captación de radicales libres son capaces de luchar contra el estrés oxidativo en células o tejidos dañados.<sup>38</sup> También hay amplia evidencia de que los flavonoides están involucrados en la prevención de la pérdida de células nerviosas causada por el estrés oxidativo.<sup>39</sup> Se ha demostrado que en la condición epiléptica el nivel de marcadores de estrés oxidativo en las células neurales aumenta y los niveles de antioxidantes como GSH disminuyen.<sup>40</sup> Estudios sobre los ingredientes activos

de *B. hyrcana* han confirmado que tiene características para bloquear la glutatión-S-transferasa (GST), una enzima que conjuga el GSH con varios complejos. Como se señaló anteriormente, el BHE tiene numerosos flavonoides, que ejercen propiedades antioxidantes;<sup>41</sup> por lo tanto, al menos parcialmente, la actividad antiepiléptica y, en última instancia, la mejora en la memoria observada en este estudio puede deberse a los flavonoides presentes en el BHE, así como el control de los niveles de GSH, MDA y NO en el cerebro.

## Conclusión

En general, los resultados de este estudio indican que el BHE tiene propiedades antiepilépticas en ratas inducidas con PTZ. Además, luego de la mejora de los síntomas de las convulsiones, se observó que la tasa de memoria de las ratas mejoró. Estos efectos pueden atribuirse a la mejora del estado de estrés oxidativo, incluido un mayor contenido de GSH y una disminución de los niveles de MDA y NO.

## Referencias

1. Katayayan A, Diaz-Medina G. Epilepsy: Epileptic syndromes and treatment. *Neurol Clin.* 2021;39(3):779-795. doi:10.1016/j.ncl.2021.04.002
2. Suleymanova EM. Behavioral comorbidities of epilepsy and neuroinflammation: Evidence from experimental and clinical studies. *Epilepsy Behav.* 2021;117:107869. doi:10.1016/j.yebeh.2021.107869
3. Fattorusso A, Matricardi S, Mencaroni E, et al. The pharmacoresistant epilepsy: An overview on existant and new emerging therapies. *Front Neurol.* 2021;12:674483. doi:10.3389/fneur.2021.674483
4. Holmes GL. Cognitive impairment in epilepsy: the role of network abnormalities. *Epileptic Disord.* 2015;17(2):101-116. doi:10.1684/epd.2015.0739
5. Waldbaum S, Patel M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2010;88(1):23-45.
6. Costello DJ, Delanty N. Oxidative injury in epilepsy: Potential for antioxidant therapy? *Expert Rev Neurother.* 2004;4(3):541-553.
7. Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;928(1):22-38.
8. Migliore L, Fontana I, Colognato R, Coppede F, Siciliano G, Murri L. Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging.* 2005;26(5):587-595.
9. Bonda DJ, Lee H-P, Lee H-g, et al. Novel therapeutics for Alzheimer's disease: an update. *Curr Opin Drug Discov Dev.* 2010;13(2):235.
10. Ashrafi MR, Shams S, Nouri M, et al. A probable causative factor for an old problem: selenium and glutathione peroxidase appear to play important roles in epilepsy pathogenesis. *Epilepsia.* 2007;48(9):1750-1755.
11. Shin E-J, Jeong JH, Chung YH, et al. Role of oxidative stress in epileptic seizures. *Neurochem Int.* 2011;59(2):122-137.

12. Kumar A, Lalitha S, Mishra J. Possible nitric oxide mechanism in the protective effect of hesperidin against pentylenetetrazole (PTZ)-induced kindling and associated cognitive dysfunction in mice. *Epilepsy Behav.* 2013;29(1):103-111. doi:10.1016/j.yebeh.2013.06.007
13. Saha L, Chakrabarti A. Understanding the anti-kindling role and its mechanism of Resveratrol in Pentylenetetrazole induced-kindling in a rat model. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;120:57-64. doi:10.1016/j.pbb.2014.01.010
14. Kowski AB, Weissinger F, Gaus V, Fidzinski P, Losch F, Holtkamp M. Specific adverse effects of antiepileptic drugs--A true-to-life monotherapy study. *Epilepsy Behav.* 2016;54:150-157. doi:10.1016/j.yebeh.2015.11.009
15. Pahuja M, Mehla J, Kumar Gupta Y. Anticonvulsant and antioxidative activity of hydroalcoholic extract of tuber of *Orchis mascula* in pentylenetetrazole and maximal electroshock induced seizures in rats. *J Ethnopharmacol.* 2012;142(1):23-27. doi:10.1016/j.jep.2012.04.006
16. Babar ZU, Ata A, Meshkatsadat MH. New bioactive steroidal alkaloids from *Buxus hyrcana*. *Steroids.* 2006;71(13-14):1045-1051. doi:10.1016/j.steroids.2006.09.002
17. Choudhary MI, Shahnaz S, Parveen S, et al. New cholinesterase-inhibiting triterpenoid alkaloids from *Buxus hyrcana*. *Chem Biodivers.* 2006;3(9):1039-1052. doi:10.1002/cbdv.200690102
18. Esmaeili S, Naghibi F, Mosaddegh M, Sahranavard S, Ghafari S, Abdullah NR. Screening of antiplasmodial properties among some traditionally used Iranian plants. *J Ethnopharmacol.* 2009;121(3):400-404. doi:10.1016/j.jep.2008.10.041
19. Ata A, Iverson CD, Kalhari KS, et al. Triterpenoidal alkaloids from *Buxus hyrcana* and their enzyme inhibitory, anti-fungal and anti-leishmanial activities. *Phytochemistry.* 2010; 71(14-15):1780-1786. doi:10.1016/j.phytochem.2010.06.017
20. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Bahramian F, Bekhradnia AR. Antioxidant and free radical scavenging activity of *H. officinalis* L. var. *angustifolius*, *V. odorata*, *B. hyrcana* and *C. speciosum*. *Pak J Pharm Sci.* 2010; 23(1):29-34.
21. Mesaik MA, Halim SA, Ul-Haq Z, et al. Immunosuppressive activity of buxidin and E-buxenone from *Buxus hyrcana*. *Chem Biol Drug Des.* 2010; 75(3):310-317. doi:10.1111/j.1747-0285.2009.00906.x
22. Azizi V, Allahyari F, Hosseini A. The antiepileptic and neuroprotective effect of the *Buxus hyrcana* Pojark hydroethanolic extract against the pentylenetetrazol induced model of the seizures in the male rats. *Int J Neurosci.* 2018; 128(10):913-919. doi:10.1080/00207454.2018.1443925
23. Pahuja M, Mehla J, Reeta KH, Tripathi M, Gupta YK. Effect of *Anacyclus pyrethrum* on pentylenetetrazole-induced kindling, spatial memory, oxidative stress and rho-kinase II expression in mice. *Neurochem Res.* 2013; 38(3):547-556. doi:10.1007/s11064-012-0947-2
24. Gomar A, Hosseini A, Mirazi N. Preventive effect of *Rubus fruticosus* on learning and memory impairment in an experimental model of diabetic neuropathy in male rats. *PharmaNutrition.* 2014;2(4):155-160.
25. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 1963;61:882-888.
26. Biswas D, Banerjee M, Sen G, et al. Mechanism of erythrocyte death in human population exposed to arsenic through drinking water. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008; 230(1):57-66. doi:10.1016/j.taap.2008.02.003
27. Schulz K, Kerber S, Kelm M. Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO<sub>2</sub>- in aqueous and protein-containing samples. *Nitric Oxide Biol Chem.* 1999; 3(3):225-234. doi:10.1006/niox.1999.0226
28. Choudhary KM, Mishra A, Poroikov VV, Goel RK. Ameliorative effect of Curcumin on seizure severity, depression like behavior, learning and memory deficit in post-pentylenetetrazole-kindled mice. *Eur J Pharmacol.* 2013; 704(1-3):33-40.
29. Mariani E, Polidori M, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B.* 2005; 827(1):65-75.
30. Perry G, Nunomura A, Hirai K, et al. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? *Free Radic Biol Med.* 2002;33(11):1475-1479.
31. Sudha K, Rao AV, Rao A. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. *Clin Chim Acta.* 2001; 303(1-2):19-24.
32. Zhao R-r, Xu X-c, Xu F, et al. Metformin protects against seizures, learning and memory impairments and oxidative damage induced by pentylenetetrazole-induced kindling in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 448(4):414-417.
33. Rauca C, Zerbe R, Jantze H. Formation of free hydroxyl radicals after pentylenetetrazol-induced seizure and kindling. *Brain research.* 1999;847(2):347-351.
34. Nassiri-Asl M, Moghbelinejad S, Abbasi E, et al. Effects of quercetin on oxidative stress and memory retrieval in kindled rats. *Epilepsy Behav.* 2013;28(2):151-155.
35. Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(3):205-214. doi:10.1038/nrd1330
36. Stewart VC, Heales SJ. Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34(3):287-303. doi:10.1016/s0891-5849(02)01327-8
37. Murashima YL, Yoshii M, Suzuki J. Ictogenesis and epileptogenesis in EL mice. *Epilepsia.* 2002;43 Suppl 5:130-135. doi:10.1046/j.1528-1157.43.s.5.35.x
38. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Meth Enzymol.* Elsevier. 1990; 186: 343-355.
39. Ishige K, Schubert D, Sagara Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30(4):433-446.
40. Cárdenas-Rodríguez N, Coballase-Urrutia E, Pérez-Cruz C, et al. Relevance of the glutathione system in temporal lobe epilepsy: evidence in human and experimental models. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:759293-759293. doi:10.1155/2014/759293
41. Wollenweber E, Rustaiyan A. Exudate flavonoids in three persian asteraceae species. *Biochem Syst Ecol.* 1991; 19(8):673-675. doi:10.1016/0305-1978(91)90084-D

Artículo sin conflicto de interés

© Archivos de Neurociencias