



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Trabajo de Tesis Doctoral

**Desarrollo de un modelo de convulsiones
farmacorresistentes en ratones.
Evaluación de nuevos fármacos para
el control de la farmacorresistencia.**

Farm. Andrea Verónica Enrique

Director: Dr. Luis Enrique Bruno Blanch /
Co- Directoras: Dra. Elena Girardi – Dra. Nora Mariel Marder

2016

Agradecimientos

En primer lugar agradezco a mis directores, Luis, Elena y Mariel por su dedicación y su confianza.

A la Facultad de Ciencias Exactas - UNLP, UBA, CONICET, ANPCyT

A la directora del IBCN, Alicia Brusco.

A Alan por su asesoramiento permanente.

A mis "ratoneros": Sofi, Facu y Ro por su invaluable ayuda.

A mis compañeros y amigos del LIDeB, que fueron sin duda lo más importante y valioso de esta experiencia: Caro, Malalita, Luci, Mauri, Pome, Luqui, Mari, Roque, Sarita, Meli, Pablo, Lau, Fede, Juani, Sofi, Alan, Espe, Pachi, Seba, Manu, Julián, Valen.

A Juan José Lopez, a Marina y a Manuel del IBCN por su colaboración.

A Luisa Rocha, a Sandra Orozco y a sus respectivos grupos de trabajo por los conocimientos transmitidos y las experiencias compartidas.

A mi familia y amigos que siempre estuvieron presentes y pendientes.

A Gonzalo, mi compañero incondicional.

A las políticas en ciencia y tecnología que permitieron que esto sea posible.

Abreviaturas

AA: Ácido Araquidónico

ABC: ATP binding cassette

ADT: Umbral Post Descarga

AK: Acido Kaínico

BCRP: Proteína de Resistencia en Cáncer de Mama

BHE: Barrera hemato-encefálica

BLA: Estimulación Eléctrica de la Amígdala Basolateral

CAR: Receptor Nuclear de Androstano

CBZ: Carbamazepina

CERs: Convulsiones Espontáneas Recurrentes

CMC: Carboximetilcelulosa

COX-2: Ciclooxigenasa-2

CXCL10: Quimioquina 10 tipo CXC

DC: Dieta Cetogénica

DE50: Dosis Efectiva 50

DE97: Dosis Efectiva 97

DT50: Dosis Tóxica 50

DZP: Diazepam

EEG: Electroencefalograma

EFA: Fundación Americana de Epilepsia

ELT: Epilepsia del Lóbulo Temporal

EMT: Estimulación Magnético Transcraneal

EP-1: Receptor 1 de Prostaglandina E2

ET-1: Endotelina 1

FAEs: Fármacos Antiepilépticos

GAD: Ácido Glutámico Descarboxilasa

IBE: Oficina Internacional para la Epilepsia

ILAE: Liga Internacional Contra la Epilepsia

iNOS: Oxido Nítrico Sintetasa Inducible

i.p.: Intraperitoneal

IP: Índice de Protección

LEV: Levetiracetam

LPS: Lipopolisacárido

MDCK: Células Madin-Darby de riñón canino.

MDR: Resistencia a Múltiples Fármacos

MES: *Maximal Electroshock Seizure*

MP: Ácido 3-Mercaptopropionico

MP23: animales administrados con MP durante 23 días

MRPs: Proteínas de Resistencia a Múltiples Fármacos

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NIH: Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos

NIMO: Nimodipina

OMS: Organización Mundial de la Salud

PB: Fenobarbital

PEG: Polietilenglicol 400

PGE2: Prostaglandina E2

Pgp: Glicoproteína P

PHT: Fenitoína PXR: Receptor Nuclear de Pregnano

PILO: Pilocarpina

PKC β II: Proteína Kinasa C β II

PL: Fosfolípidos de membrana

PLA2: Fosfolipasa A2

Programa ADD: Programa de Desarrollo de Fármacos Antiepilépticos

PTZ: Pentilenetetrazol

RK: *Kindling* rápido

S23: animales administrados con solución salina durante 23 días

s.c.: Subcutanea

SE: *Status Epilepticus* o Estado Epiléptico

SK: *Kindling* clásico o lento

SNC: Sistema Nervioso Central

TEM: Tiempo de Efecto Máximo

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral α

TTM: Tiempo de Toxicidad Máxima



Índice

Introducción	1
CAPÍTULO I: Epilepsia	3
Clasificación de las epilepsias.....	6
Causas	11
Epilepsia en el mundo	12
Tratamientos	13
Fármacos antiepilépticos	13
Dieta Cetogénica.....	14
Estimulación cerebral profunda.....	17
Estimulación del nervio Vago	18
Estimulación magnética transcraneal.....	20
Cirugía	21
Pronóstico.....	23
Mortalidad.....	25
Aspectos económicos	26
Aspectos psicosociales.....	29
Referencias	32
CAPÍTULO II: Fármacos Antiepilépticos y Farmacorresistencia	37
Mecanismos implicados en la farmacorresistencia	46
Hipótesis de la severidad intrínseca.....	46
Hipótesis de los blancos farmacológicos.....	47

Hipótesis de los transportadores	49
Hipótesis de las variaciones genéticas	49
Hipótesis de las redes neuronales.....	50
Transportadores ABC.....	52
Expresión de proteínas de transporte en BHE.....	54
Sobreexpresión de transportadores ABC.....	59
Sobreexpresión de transportadores ABC por exposición a xenobióticos.....	61
Sobreexpresión de transportadores ABC por crisis repetidas.	62
Sobreexpresión de transportadores ABC por neuroinflamación.	64
Estrategias para el tratamiento de epilepsia farmacorresistente por sobreexpresión de transportadores ABC	66
Referencias	70
CAPÍTULO III: Modelos para la Evaluación de Anticonvulsivos.....	81
Modelos de convulsiones agudas	87
Maximal Electroshock Seizure (MES).....	87
Pentilinetetrazol (PTZ).....	89
Modelo de crisis parciales (6 Hz)	91
Modelos de Epilepsia.....	93
Modelos de convulsiones recurrentes espontáneas subsecuentes al estado epiléptico	94
Modelo de Ácido Kaínico.....	96
Modelo de Pilocarpina.....	98
Estimulación eléctrica prolongada de la amígdala basolateral (BLA).....	102
Modelos de Kindling	103
Kindling Eléctrico.....	104
Kindling corneal 6 Hz.....	107

Kindling químico: PTZ kindling	108
Resistencia a fármacos en modelos de epilepsia:.....	110
Relevancia de la severidad intrínseca en modelos de farmacorresistencia.....	115
Otros modelos de farmacorresistencia de utilidad en la evaluación de fármacos.....	117
Modelos de convulsiones farmacorresistentes inducidas por ácido 3-mercaptopropionico (MP).....	117
Modelos genéticos.....	119
Modelos <i>In Vitro</i> para el estudio de la permeabilidad cerebral.....	120
Referencias	124
CAPÍTULO IV: Metodología y resultados I:	
Desarrollo y validación del modelo.....	133
Determinación de la dosis de MP:	138
Caracterización de las convulsiones:	140
Determinación del tiempo de tratamiento.....	141
Sobreexpresión de Pgp en animales tratados con MP durante 23 días.	145
Evaluación de expresión de Pgp mediante inmunohistoquímica.....	146
Evaluación de expresión de Pgp mediante western blot.....	153
Relación entre la resistencia a PHT y la sobreexpresión de Pgp	158
Extensión de la farmacorresistencia a otros FAEs	163
Evaluación de la actividad de PB en animales MP23.....	163
Evaluación de la actividad de FAEs no sustratos de Pgp en animales MP23.....	168
Tratamientos alternativos	172
Administración de MP 2 veces al día	172
Evaluación de los animales MP23 en prueba MES.....	175

Evaluación de los animales MP23 en prueba s.c.PTZ	177
Referencias	180
CAPÍTULO V: Metodología y resultados II	
Inhibidores de COX-2 como tratamiento adicional a la terapia antiepiléptica.	181
Evaluación de la actividad anticonvulsivante en los modelos MES y PTZ.	185
Evaluación de la actividad anticonvulsivante frente a la administración aguda de MP... ..	190
Administración prolongada de fármacos inhibidores de COX-2 para la prevención de resistencia a PHT en el modelo recientemente desarrollado.	193
Referencias	201
CAPÍTULO VI: Discusión y Conclusiones	
203	
Desarrollo del modelo de convulsiones farmacorresistentes en ratones	217
Inhibidores de COX-2 como tratamiento adicional a la terapia antiepiléptica.	209
Ventajas y limitaciones del nuevo modelo	210
Perspectivas.....	213
Referencias	216
Publicaciones científicas	219



Introducción

La epilepsia es un trastorno neurológico que afecta al 1-2% de la población mundial. Cerca del 80% de los pacientes con epilepsia viven en países subdesarrollados o en vías de desarrollo y, según la OMS, las $\frac{3}{4}$ partes no reciben el tratamiento que necesitan.

La discriminación y la estigmatización que rodean al paciente que padece epilepsia son a menudo más difíciles de vencer que las propias convulsiones, las cuales pueden ser discapacitantes, condicionando su desarrollo social y laboral.

El tratamiento de primera elección es el farmacológico, pero presenta una importante limitación: el 30% de los pacientes con epilepsia no responden satisfactoriamente a la medicación. Es por este motivo que se han buscado otras alternativas para el control de la enfermedad, así como el desarrollo de nuevos fármacos que superen esta limitación.

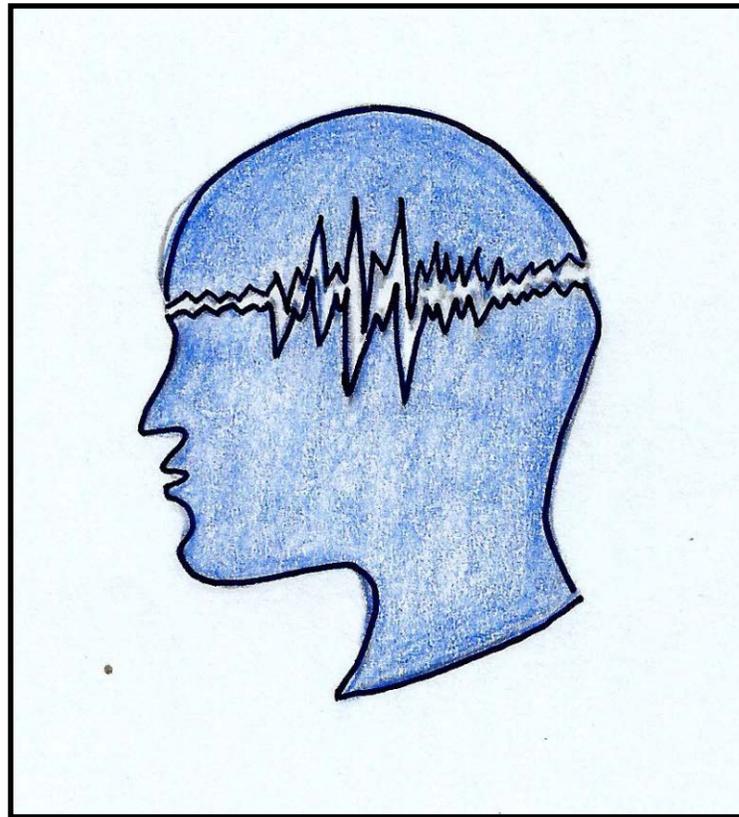
*El Laboratorio de Investigaciones y Desarrollo de Bioactivos (LIDeB), se ha dedicado desde su inicio a la búsqueda de nuevos compuestos con actividad anticonvulsivante. En los últimos años, esa búsqueda fue dirigida a mejorar la eficacia del tratamiento farmacológico teniendo en cuenta el alto porcentaje de refractariedad. Una limitación determinante en el descubrimiento de fármacos es la disponibilidad de modelos *in vivo* que permitan la evaluación rápida y económica de los nuevos compuestos y que representen de la mejor manera posible el escenario clínico. Los modelos de epilepsia existentes son útiles en las etapas avanzadas de la evaluación de fármacos, pero resultan inadecuados para las etapas iniciales, donde la diversidad de compuestos candidatos es muy amplia.*

*El desarrollo de un modelo eficiente de convulsiones fármacorresistentes en ratones es una herramienta indispensable para la evaluación de los compuestos obtenidos en el LIDeB mediante diseño racional y síntesis, o selección mediante modelos *in silico*.*

El objetivo general de esta tesis es desarrollar un modelo de convulsiones fármacorresistentes asociadas a la sobreexpresión de glicoproteína P en ratones, de manera de aportar una herramienta útil a la búsqueda de nuevos compuestos con potencial acción en la epilepsia refractaria.

CAPÍTULO I

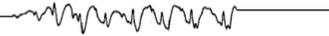
Epilepsia



Capítulo I

Epilepsia

La **epilepsia** es un trastorno cerebral que se caracteriza por una predisposición duradera para generar crisis epilépticas, originando consecuencias neurobiológica, cognitivas, psicológicas y sociales de esta afección de acuerdo a la definición de la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE), (*Fisher et al 2005*). Para definir a la epilepsia se requiere la ocurrencia de al menos una crisis epiléptica con un alto riesgo de presentar otra (*Fisher et al 2014*). Una **crisis epiléptica** es una ocurrencia transitoria de ciertos signos y / o síntomas debidos a la actividad neuronal excesiva o sincronía anormal en el cerebro (*Fisher et al 2005*). La actividad eléctrica anormal es causada por cambios complejos que ocurren en las células nerviosas. Algunas convulsiones pueden ser casi imperceptibles, mientras que otras son totalmente incapacitantes. Aunque la presencia de una convulsión no siempre está asociada a un cuadro epiléptico, se ha observado que aproximadamente la mitad de las personas que tienen una convulsión, sin una causa aparente, tendrán otra, por lo general dentro de los 6 meses. La actividad eléctrica del cerebro, estudiada mediante electroencefalograma (EEG), puede predecir la ocurrencia de convulsiones debido a que ciertos patrones del EEG son característicos de la epilepsia (*Smith 2005*).



La epilepsia ha sido tradicionalmente referida como una familia de trastornos, para enfatizar que se compone de diferentes desórdenes. El término "trastorno" es poco conocido por el público y minimiza la gravedad de la epilepsia. A partir de lo expuesto, la ILAE y la Oficina Internacional para la Epilepsia (IBE) han acordado, en el año 2014, que la epilepsia puede considerarse una enfermedad (*Fisher et al 2014*). Sin embargo, resulta más adecuado hablar de **las epilepsias**, debido a que existen más de 40 formas clínicas de epilepsia.

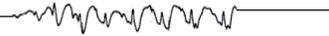
Clasificación de las epilepsias

La epilepsia incluye un grupo de trastornos con distinta etiología y tratamiento. Es esencial la clasificación adecuada de las crisis epilépticas y de los síndromes epilépticos para lograr un correcto diagnóstico y tratamiento. En general, es importante establecer la distinción entre Epilepsias Idiopáticas o Primarias y Epilepsias Sintomáticas o Secundarias. Las epilepsias Idiopáticas tienen un origen desconocido, presumiblemente genético. Son habitualmente de curso benigno y tienden a la remisión espontánea, con algunas excepciones como la epilepsia mioclónica juvenil. Las epilepsias sintomáticas se deben a enfermedades neurológicas diagnosticables, originadas en anomalías o lesiones. En estos casos las crisis pueden ser la única manifestación clínica o bien pueden ser parte de un espectro clínico más amplio y puede ser necesario tratar la enfermedad, anomalía o lesión en sí, antes de hacer un diagnóstico sobre el caso. El término criptogénico se aplica cuando se sospecha una etiología

sintomática pero no ha sido posible demostrarla. En estos casos depende esencialmente de la disponibilidad de recursos de diagnósticos y de las destrezas médicas (*Informe sobre la epilepsia en Latinoamérica ILAE 2008*).

La Comisión de Clasificación y Terminología de la ILAE realizó la última actualización de la terminología y clasificación de las epilepsias en el año 2010. Dicha propuesta no es permanente, sino que forma parte de una transición a un sistema que, en última instancia, permita la traducción significativa del conocimiento científico para la clasificación de las epilepsias con un propósito clínico u otros. Recientemente se re-abrió la discusión respecto de la clasificación de las convulsiones y las epilepsias; las modificaciones propuestas aún no han sido publicadas (*Fisher et al 2016*).

Las convulsiones pueden ser descritas a partir de dos grupos principales, convulsiones primarias generalizadas y convulsiones focales (Figura 1). La diferencia entre los tipos de convulsiones radica en cómo y en qué lugar del cerebro se desencadenan. Las convulsiones primarias generalizadas comienzan con una descarga eléctrica extendida que afecta a ambos hemisferios del cerebro a la vez. Los factores hereditarios son importantes en muchos de estos ataques. Por otro lado, las convulsiones focales comienzan con una descarga eléctrica en un área limitada del cerebro y se restringen a un solo hemisferio. Muchas causas pueden desencadenar convulsiones focales, tales como, traumatismo de cráneo, infecciones cerebrales, derrame cerebral, tumor o fallas en la formación de algún área del



cerebro antes del nacimiento (displasia cortical). Otras veces, no se encuentra una causa conocida, sin embargo los factores genéticos también pueden ser importantes en algunas convulsiones focales (*Berg 2010*).

Las crisis epilépticas son transitorias, demarcadas en el tiempo, con un claro comienzo. La terminación de una crisis epiléptica suele ser menos notable debido a que la sintomatología del período post-ictal puede enmascarar el final de la crisis. El estatus epiléptico (SE) es una circunstancia especial con convulsiones prolongadas o recurrentes, no obstante, un análisis clínico y electroencefalográfico usualmente permite diagnosticarlo con precisión.

Las convulsiones pueden afectar los sentidos, la actividad motora, la función autónoma, la conciencia, el estado emocional, la memoria, la cognición, o el comportamiento (*Fisher et al 2005*). Las descargas electroencefalográficas que ocurren durante una crisis epiléptica son ordenadas y relativamente estereotipadas. La característica más común de las crisis es una sincronía neuronal anormalmente aumentada.

Si bien, la corteza cerebral es el principal elemento en la generación de las crisis epilépticas, en algunas circunstancias, las convulsiones también pueden originarse en el sistema interactivo talamocortical o en el tronco cerebral.

Figura 1: Casificación de las convulsiones propuesta por la ILAE 2016 (Fisher et al 2016):



Los distintos síndromes epilépticos pueden caracterizarse por el tipo de convulsiones comúnmente presentadas, la edad en las que comienzan los síntomas, la región o estructura del cerebro involucradas, el curso de la enfermedad, la información genética, ciertos patrones presentes en el electroencefalograma durante el período ictal o post-ictal, u otras características típicas de cada epilepsia. La tabla 1 ilustra la clasificación de las epilepsias realizada por la Comisión de Clasificación y Terminología de la ILAE en el año 2010 (Jette et al 2015).

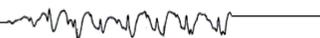


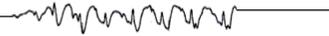
Tabla 1: Clasificación de las epilepsias

Epilepsias según la edad de inicio				
Período neonatal	Infancia temprana	Niñez	Adolescencia - adultez	Menos relacionadas con la edad
Epilepsia neonatal familiar benigna	Epilepsia de la infancia con migración de convulsiones focales	Convulsiones febriles plus (pueden empezar en la infancia)	Epilepsia de ausencia juvenil	Epilepsia familiar focal con foco variable
Encefalopatía mioclónica temprana	Síndrome de West	Síndrome Panayiotopoulos	Epilepsia mioclónica juvenil	Epilepsias reflejas
Síndrome de Ohtahara	Epilepsia mioclónica de la infancia	Epilepsia con convulsiones mioclónicas atónicas	Epilepsia con convulsiones generalizadas tónico-clónicas	
	Epilepsia infantil benigna	Epilepsia benigna con espigas centrotemporales	Epilepsia mioclónica progresiva	
	Epilepsia infantil familiar benigna	Epilepsia nosctura autosómica dominante del lóbulo frontal	epilepsia autosómica dominante con características auditivas	
	Encefalopatía mioclónica en desordenes no progresivos	Epilepsia occipital iniciada en el final de la niñez (tipo Gastaut)	Otras epilepsias familiares del lóbulo temporal	
	Síndrome de Dravet	Epilepsia con ausencias mioclónicas		
Síndrome de Lennox-Gastaut				
Encefalopatía epiléptica con punta onda continua durante el sueño				
	Síndrome Landau-Kleffner			
	Epilepsia ausencia de la niñez			
Constelaciones distintivas		Epilepsias atribuidas a causas metabólico - estructurales		
Epilepsia del lóbulo temporal mesial con esclerosis hipocampal		Malformaciones en el desarrollo cortical		
Síndrome de Rasmussen		Síndromes neurocutaneos (esclerosis tuberosa compleja - Sturge-Weber)		
Convulsiones gelásticas con hamartoma hipotalámico		Tumor - infección - trauma - insulto perinatal - ACV		
Hemiconvulsión-hemiplejía-epilepsia				

Causas

Frecuentemente, las causas de las crisis epilépticas implican alguna lesión en el cerebro. Algunos de las principales motivos de la epilepsia incluyen bajo nivel de oxígeno durante el parto, lesiones en la cabeza producidas durante el parto o bien accidentes durante la juventud o la edad adulta, tumores cerebrales, condiciones genéticas que dan lugar a lesión cerebral (como la esclerosis tuberosa), infecciones como meningitis o encefalitis, accidentes cerebrovasculares o cualquier otro tipo de daño al cerebro, niveles anormales de sustancias tales como sodio o azúcar en la sangre (*Liu et al 2016; Berg & Scheffer 2011*).

La información proveniente de países en desarrollo muestra que la proporción de epilepsia idiopática - criptogénica (60-70 %) con respecto a la sintomática (30-40 %) es mayor a la reportada en los países desarrollados (*Carpio y Pesantes 2004*). Dentro del grupo sintomático, las enfermedades infecciosas, las parasitarias, particularmente la neurocisticercosis, el daño cerebral perinatal y el traumatismo de cráneo, son los desórdenes más frecuentes que se han reportado como causa de epilepsia (*Carpio et al 1998; Bharucha & Shorvon 1997*). La mayor frecuencia se relaciona con daño cerebral perinatal y cisticercosis (8-10 % de los casos), seguidos por el trauma cerebral e infecciones del sistema nervioso central (4-6 % de los casos) (*Informe sobre la epilepsia en latinoamerica ILAE 2008*).



Epilepsia en el mundo

Aproximadamente 65 millones de personas en el mundo tienen epilepsia, siendo una de las enfermedades neurológicas más comunes a nivel mundial (*Thurman et al 2011*).

La proporción estimada de la población general con epilepsia activa (es decir con convulsiones continuas o con la necesidad de tratamiento) es de entre 4 y 10 cada 1000 personas. Estudios realizados en países de bajos y medianos ingresos sugieren que la proporción en los mismos es mucho mayor. En estudios realizados en Latinoamérica y El Caribe se ha reportado que las tasas de epilepsia activa, sin ajuste por edad, varían entre los 6 por 1000 en Cuba a los 57 por 1000 en Panamá (*Reséndiz Aparicio 2013*). La prevalencia de epilepsia activa en Argentina es de 3,8 cada 1000 habitantes (aproximadamente 180000 pacientes con diagnóstico de epilepsia) según el último reporte que data del año 2007 (*Melcon et al 2007*).

A nivel mundial, se estima que 2,4 millones de personas son diagnosticadas con epilepsia cada año. En los países de ingresos altos, los nuevos casos anuales son entre 30 y 50 por cada 100000 personas. En los países de bajos y medianos ingresos, esta cifra puede ser hasta dos veces mayor. Esta diferencia se debe, probablemente, al aumento del riesgo de las condiciones endémicas como la malaria o neurocisticercosis; la mayor incidencia de los accidentes de tránsito; lesiones relacionadas con el parto; y las variaciones en la infraestructura médica, disponibilidad de programas de salud preventiva y atención accesible. Cerca del

80% de las personas con epilepsia viven en países de bajos y medianos ingresos (*World Health Organization, 2016*).

Si bien la epilepsia afecta a personas de todas las edades, alrededor del 30% de los nuevos casos ocurren en niños. Los niños y los adultos mayores son los que, con mayor frecuencia, se ven afectados.

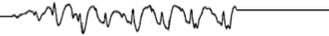
Tratamientos

1- Fármacos antiepilépticos

Hoy en día disponemos de más de 40 fármacos antiepilépticos (FAEs) que presentan distintos mecanismos de acción, fundamentalmente sobre canales iónicos voltaje-dependientes, activando el sistema GABA inhibitorio o inhibiendo el sistema excitatorio dependiente de glutamato (*Löscher & Schmidt 2011*). La eficacia de los distintos FAEs disponibles reside en la capacidad de modular la hiperexcitabilidad neuronal patológica que caracteriza a la epilepsia. La elección de los fármacos antiepilépticos, en monoterapia o en combinación, se realiza dependiendo del trastorno convulsivo y de la respuesta del paciente.

Los FAEs proveen un control satisfactorio de las convulsiones en el 70% de los casos, permaneciendo un 30% de los pacientes con un cuadro no controlado (*Laxer et al 2014*). En el capítulo II de la presente tesis se abordan, de manera más amplia, aspectos de la farmacoterapia y la resistencia a los fármacos.

Otros tratamientos alternativos pueden utilizarse de acuerdo al tipo de epilepsia y a las características de cada paciente.



2- Dieta Cetogénica

Los tratamientos dietéticos fueron ideados para muchas condiciones neurológicas tales como tumores cerebrales, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, y esclerosis lateral amiotrófica.

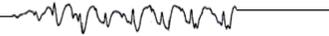
La dieta cetogénica (DC) se utiliza ampliamente para el tratamiento de la epilepsia desde la década de 1920. Esta dieta se basa en sustituir los hidratos de carbono por un alto contenido de lípidos, y una restricción en el aporte de proteínas, imitando una situación de ayuno (lo que se conocía desde la época de Hipócrates como un posible remedio para la epilepsia) (*Bailey et al 2005*). Con ello se genera un estado de cetosis a expensas del metabolismo de los ácidos grasos. No se conoce exactamente por qué motivo esta dieta consigue disminuir el número de crisis. Se han propuesto varios mecanismos, incluyendo cambios en la producción de ATP haciendo a las neuronas más resistentes frente a la demanda metabólica durante las convulsiones; alteración del pH cerebral lo cual afecta a la excitabilidad neuronal; efectos inhibidores directos de cuerpos cetónicos o ácidos grasos sobre los canales iónicos y; cambios en el metabolismo de aminoácidos para favorecer la síntesis del neurotransmisor inhibitor GABA (*Barañano & Hartman 2008; Newman & Verdin 2014*).

En los años 50, con la introducción de FAEs, el uso de la DC disminuyó por ser considerada difícil de realizar y desagradable y fue reemplazada por la administración de fenitoína y valproato de sodio. En los últimos 25 años, al no

obtener los resultados esperados con los nuevos FAEs, ha habido un resurgimiento en el uso de este tratamiento en los casos de epilepsia refractaria, dado que demostró mayor efectividad (*Lee & Kossoff 2011*).

Hoy en día se considera que la DC es una terapia opcional segura y efectiva no sólo para niños (*Pablos-Sánchez et al 2014*), sino también para adultos con epilepsia refractaria (*Caraballo & Vining 2012*). Existen determinados síndromes epilépticos en los cuales la DC ha demostrado ser eficaz en el control de las crisis. En otros síndromes la eficacia no está totalmente definida, pero se considera que la DC puede incluirse como una opción válida de tratamiento para lograr el control de las crisis. Una correcta selección y evaluación del paciente es muy importante para aumentar la posibilidad de éxito (*Lee & Kossoff 2011*). En los casos de convulsiones refractarias a las terapias con FAEs, lo indicado sería probar la DC, independientemente de la edad o el sexo del paciente. Una vez que un paciente no ha respondido a por lo menos tres regímenes apropiados con FAEs, la posibilidad de control de los síntomas con otro fármaco disminuye drásticamente (*Armeno et al 2014*).

La DC se considera un tratamiento de primera elección cuando se ha demostrado que existe una deficiencia de la enzima transportadora de glucosa (déficit de Glut 1) y en los casos de deficiencia del complejo piruvato deshidrogenasa. En ambas condiciones proporciona las cetonas que sobrepasan el defecto metabólico y sirven como combustible alternativo para el cerebro; por lo



tanto, se deberá aplicar lo antes posible cuando ha sido diagnosticado adecuadamente (*Lee & Kossoff 2011*).

La DC también es una opción válida en presencia de efectos adversos severos de los FAEs. Se sugiere intentar este tratamiento en los pacientes con epilepsia focal en aquellos casos en donde no es posible hacer uso de cirugía o en donde la cirugía ha fallado (*Armeno et al 2014*).

Debe notarse, además, que en ciertos cuadros epilépticos la DC está totalmente contraindicada. Esto se debe a que la adaptación metabólica a la dieta implica un cambio de los hidratos de carbonos por lípidos como fuente energética primaria. Los pacientes con trastornos del metabolismo de las grasas no pueden metabolizar los ácidos grasos y, en estos casos, la DC haría que el cuerpo consumiese sus reservas proteicas como combustible, lo que puede llevar a la acidosis y, finalmente, al coma y la muerte. Por lo tanto, está totalmente contraindicada en la deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa 1 ó 2, la deficiencia de carnitina translocasa, los defectos de β -oxidación, la deficiencia de piruvato carboxilasa y la porfiria (*Armeno et al 2014*).

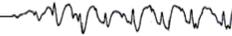
La dieta cetogénica no es un tratamiento inocuo. Dado que se trata de un plan alimentario no equilibrado tanto en macro como en micronutrientes, puede causar déficits nutricionales en energía, proteínas, minerales y vitaminas y exceso de lípidos (*Tagliabue et al 2012*), con riesgo de ocasionar efectos secundarios no

deseados. Sin embargo, estos efectos no son generalmente graves y en pocos pacientes es necesaria la interrupción de la DC (*Kossoff et al 2009*).

3- Estimulación cerebral profunda

La estimulación cerebral profunda consiste en la implantación estereotáxica de electrodos en las estructuras profundas del cerebro. El electrodo se encuentra conectado a un marcapasos colocado externamente, localizado de forma subcutánea en la pared del tórax, de manera similar a un marcapasos cardíaco. Se ha buscado un efecto antiepiléptico dirigidos a diferentes regiones del cerebro, tales como el hipocampo, la corteza motora elocuente, el cerebelo, el sistema no específico de activación en el tálamo centromedial, núcleos caudados, o núcleos subtalámicos (*Gschwind & Seeck 2016*).

Un estudio controlado multicéntrico randomizado de “estimulación bilateral del tálamo anterior para la epilepsia” (llamado estudio SANTE) fue realizado en 110 pacientes adultos con crisis focales (*Fisher et al 2010*). Usando la estimulación cerebral profunda en el tálamo anterior, la frecuencia de convulsiones disminuyó un 20% en el primer mes en todos los participantes, y posteriormente de manera significativa en un 40%. El efecto de la estimulación aumentó con el tiempo, obteniendo una reducción de las crisis del 50-70% después de varios años (*Salanova et al 2015*). Curiosamente, se obtuvieron mejores efectos en los pacientes con convulsiones del lóbulo temporal, lo que confirma la conexión privilegiada del tálamo anterior con el sistema límbico.



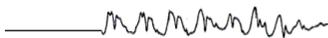
Después del estudio SANTE, la estimulación cerebral profunda en el tálamo anterior recibió la aprobación de la FDA en el año 2010 (*Fisher et al 2010*).

Las principales complicaciones se originan en el propio procedimiento de implantación quirúrgica. Una mala colocación de los electrodos causa efectos no deseados como, por ejemplo, parestesia, pérdida de memoria y deterioro del estado de ánimo. Estos efectos suelen ser reversibles (*Fisher et al 2010; Salanova et al 2015*).

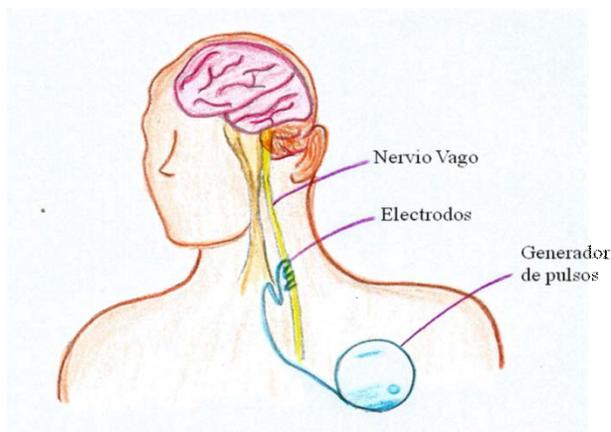
A partir de los resultados de la estimulación cerebral profunda, se ha desarrollado un sistema de “neuroestimulación sensible” RNS® (NeuroPace, Mountain View). Los electrodos implantados de manera crónica detectan la actividad epiléptica y, en respuesta, se libera una pequeña estimulación eléctrica con el fin de interrumpir esta actividad. El sitio de los electrodos se determina en cada paciente individualmente. RNS® redujo la frecuencia de convulsiones parciales en el 40% de los pacientes, asociado con una mejoría en la calidad de vida y en el estado de ánimo y sin deterioro cognitivo (*Heck et al 2014*).

4- Estimulación del nervio Vago

La estimulación del nervio vago es una forma de neuroestimulación extracraneal desarrollada hace más de 20 años (*Penry & Dean 1990*). Hoy en día es usada en todo el mundo para el tratamiento de pacientes con epilepsia refractaria que no son aptos para la cirugía de la epilepsia o en los que el beneficio de un tratamiento de este tipo es insuficiente (*Ben-Menachem 2002*). El equipo utilizado



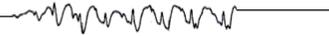
consta de un electrodo con forma de espiral que se implanta con su extremo alrededor del nervio vago extracranealmente en la región cervical yugular izquierda (el nervio vago derecho inerva el nodo sinoauricular y por lo tanto se evita). El dispositivo de estimulación se coloca por vía subcutánea en la zona clavicular izquierda o en la región torácica lateral, de manera similar al sistema de neuroestimulación sensible.



El protocolo más utilizado es la estimulación regular de 30 segundos cada 5 minutos. El paciente tiene la posibilidad de aplicar estímulos adicionales con un imán de mano, si siente un ataque inminente o aura

típica. La estimulación del nervio vago es relativamente bien tolerada y segura, los efectos secundarios más frecuentes son la tos o una modificación de la voz durante los cortos segundos de estimulación. Los efectos adversos graves son muy raros (infecciones, aspiración, arritmias cardíacas) (*Gschwind & Seeck 2016*).

Los primeros estudios de este tratamiento fueron reportados en epilepsia focal (*Thompson et al 2000*). Posteriormente, se estudió su eficacia en otros tipos de epilepsia y convulsión (*Holmes et al 2004*). Los resultados en los distintos tipos de epilepsia fueron comparables, observándose una reducción $\geq 50\%$ de la frecuencia convulsiva en 1/3 de los pacientes. El 25% de los pacientes no experimentaron

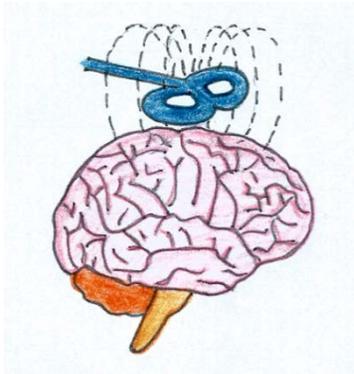


ningún efecto positivo incluso después del tratamiento a largo plazo (*Ben-Menachem 2002*).

Posteriormente, un meta-análisis sugirió que las crisis generalizadas responden mejor a la estimulación del nervio vago que las crisis parciales y que solo un 4,6% de los pacientes quedan libres de convulsiones, mientras que el 7,6% de los pacientes logran disminuir las convulsiones en un 90% (*Englot et al 2011*).

5- Estimulación magnética transcraneal

La estimulación magnética transcraneal (EMT) es una atractiva herramienta para el estudio y tratamiento de los desórdenes convulsivos. Es simple de ejecutar, relativamente económica, y generalmente segura, con el potencial de proveer medidas de excitabilidad neuronal clínica no invasiva e indolora (*Theodore 2003*).



La EMT se basa sobre el principio de la inducción eléctrica en el cerebro. Se hace circular una corriente de gran intensidad y corta duración a través de una bobina de cobre (coil), que se ubica cerca del cuero cabelludo.

Esto induce un campo magnético transitorio en el plano ortogonal a la bobina. El campo magnético atraviesa el cuero cabelludo y el cráneo, tejidos de alta resistencia, sin atenuación significativa, e induce una corriente eléctrica, de mucha menor intensidad, a nivel de la corteza, que es un medio conductor. Su penetrancia en profundidad es limitada, ya que el campo magnético decae rápidamente en

relación a la distancia. Las bobinas actualmente usadas, en forma de 8, logran una resolución espacial de alrededor de 0,5 cm. A intensidades de estimulación bajas, la excitación efectiva de los elementos neurales se produce a aproximadamente 1,5 a 2 cm de profundidad, y se acepta que activan principalmente elementos orientados horizontalmente, es decir interneuronas, la activación de las células piramidales ocurre en forma transináptica (*Mishra et al 2011*).

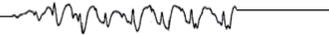
Una serie de casos han demostrado la eficacia de la estimulación magnética transcraneal en la reducción de la excitabilidad neuronal en diferentes subtipos de epilepsia, tales como la epilepsia mioclónica progresiva (*Lefaucheur 2006*), epilepsia partialis continua (también llamada epilepsia de Kojevnikov) (*Misawa et al 2005*), epilepsia refractaria a fármacos debida a malformaciones corticales (*Fregni et al 2005, 2006*), o en la epilepsia focal (*Sun et al 2012*).

Los efectos adversos más frecuente de la estimulación magnética son cefaleas y mareos que pueden ser mitigadas con analgésicos comunes.

Este tratamiento está contraindicado en niños, embarazadas, portadores de marcapasos, placas metálicas en la cabeza o válvulas de derivación de líquido cefalorraquídeo.

6- Cirugía

La cirugía de la epilepsia sólo se realiza en pacientes, que pese a tomar dosis máximas de FAEs siguen presentando crisis, las cuales les dificultan llevar una



vida normal. La falla en el control de crisis es aún mayor cuando nos referimos a epilepsia focal (50% de todas las epilepsias) (*Wieser et al 2000*).

Antes de plantear una cirugía, el paciente debe ser evaluado por un equipo médico altamente especializado y sometido a una serie de exámenes, donde se destacan: resonancia magnética de cerebro, el monitoreo continuo de videoelectroencefalografía y la evaluación neuropsicológica (*Campos et al 2004*). La meta de la cirugía es quitar el máximo de tejido epileptógeno, la lesión cerebral (de existir ésta) y ahorrar el máximo de cerebro sano. El éxito de la cirugía de la epilepsia depende de los años que lleve el paciente con epilepsia, el tipo de lesión causante de su epilepsia y el lóbulo afectado. El control total de las crisis post-cirugía fluctúa entre un 50 a 80% (*Yoon et al 2003; Wieser et al 2000; Semah et al 1998; Wiebe et al 2001*). Esto puede permitir al paciente reintegrarse a una vida normal (*Sander & Heaney 2004*).

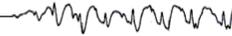
Los tipos de cirugía aplicada a la epilepsia son: a) Curativas: en ellas la meta es dejar al paciente libre de crisis, éstas corresponden a las epilepsias focales, donde se logra localizar el lugar exacto de origen de las crisis. Estas cirugías son más frecuentes en el lóbulo temporal, seguidas del lóbulo frontal; b) Paliativas: son procedimientos quirúrgicos, donde previamente se sabe que es imposible dejar al paciente totalmente libre de crisis. Sus indicaciones son: epilepsias multifocales, epilepsias primariamente generalizadas, etc.

El 80% de las cirugías de epilepsias en el mundo corresponden a cirugía sobre el lóbulo temporal dado que es la epilepsia refractaria más frecuente, además de ser la que presenta los mejores resultados postoperatorios, logrando que hasta un 80% de los pacientes queden libres o con una significativa reducción de sus crisis y solo un 10% permanece sin cambios (*Campos et al 2004*).

La cirugía precoz es el tratamiento de elección para algunos síndromes epilépticos refractarios. El reconocimiento precoz de la farmacorresistencia en niños y su pronta cirugía, permite no solo el control de las crisis, sino, también un mejor desarrollo neurológico (*Alonso-Vanegas et al 2004*).

Pronóstico

El pronóstico en la epilepsia se refiere a la probabilidad de alcanzar la remisión de las crisis epilépticas de forma espontánea o bajo tratamiento con fármacos antiepilépticos, o no conseguirla a pesar de un tratamiento oportuno. Aproximadamente más de dos tercios de los pacientes epilépticos tratados, entrarán en remisión total (*Sander & Sillanpää 1997*). Los antecedentes que existen en la literatura sobre el pronóstico de una crisis única son conflictivos. Cuando se ha producido la repetición de una crisis convulsiva en un periodo de tiempo relativamente corto existe consenso respecto a la necesidad de iniciar un tratamiento anticonvulsivante. Mientras más tiempo continúe el paciente teniendo crisis después de iniciado el tratamiento, menor será la probabilidad de que se logre una remisión completa. Por lo tanto, la respuesta precoz al tratamiento es



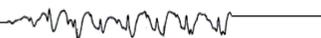
una guía importante para el pronóstico futuro de la epilepsia (*Informe sobre la Epilepsia en Latinoamérica ILAE, 2008*).

Algunos autores han sugerido que el número de crisis convulsivas que presenta el paciente antes de iniciar el tratamiento constituye un factor pronóstico; mientras mayor es el número de crisis, peor es el pronóstico. Se ha observado además que el tiempo que media entre una crisis y la subsiguiente se va acortando, lo que sugiere que en algunos pacientes existe un proceso de escalada que probablemente debe ser interrumpido lo antes posible. La edad de inicio de la epilepsia también constituye en general un factor pronóstico. Hay cierto consenso de que las crisis convulsivas que comienzan dentro del primer año de vida y que traducen una patología cerebral conllevan un peor pronóstico. En cambio, la epilepsia de la niñez, con inicio luego del año de vida (2 - 16 años), es de mejor pronóstico y es más probable que entre en remisión que la epilepsia de inicio en la edad adulta, debido a la existencia de las formas genéticas benignas. La forma clínica de la epilepsia es otro factor pronóstico de gran importancia. Los porcentajes de remisión de las crisis varían desde 60 a 80 %, en pacientes portadores sólo de crisis convulsivas generalizadas tónico-clónicas, a 20-60 % de remisión en pacientes portadores de crisis parciales complejas. Los pacientes con crisis parciales complejas y crisis convulsivas secundariamente generalizadas parecen tener un mal pronóstico. En tales pacientes es frecuente observar que los tratamientos anticonvulsivantes logran buen control de las crisis generalizadas

pero las crisis parciales continúan. Otras epilepsias generalizadas de la infancia presentan pronósticos variables. Por ejemplo, la epilepsia mioclónica juvenil muestra alta frecuencia de recurrencia al intentar suspender el tratamiento. Alrededor del 70-80 % de los pacientes portadores de ausencias simples (Petit Mal) entran en remisión. Las ausencias complejas muestran un porcentaje de remisión algo menor que varía entre 33-65 %. Los pacientes con Síndrome de West o Lennox Gastaut logran remisiones de 35 a 50%. La alteración frecuente del desarrollo psicomotor agrava el pronóstico de estas formas de epilepsia. (*Informe sobre la epilepsia en Latinoamérica ILAE, 2008*).

Mortalidad

Las personas que presentan epilepsia tienen un riesgo de morir 2 a 4 veces más elevado que la población general. Esto está asociado, por una parte, a la enfermedad de base que genera la epilepsia, pero por otra, directamente con la ocurrencia de las crisis (*Devilat & Rivera 2004*). Se destacan en éste último punto, las muertes asociadas a estado epiléptico, muertes por inmersión, trauma, quemaduras derivadas de una crisis, el cuadro de muerte súbita inesperada, muertes por aspiración o bien obstrucción de vía aérea determinada por alimentos. También deben considerarse muertes relacionadas al uso de fármacos anticonvulsivantes o cirugía de la epilepsia y finalmente suicidios. Estos últimos tienen tasas superiores a la población general, especialmente en pacientes con



epilepsia severa y epilepsia del lóbulo temporal (*Informe sobre la Epilepsia en Latinoamérica ILAE, 2008*).

Aspectos económicos

En los países en vías de desarrollo existe una brecha entre el número de personas con epilepsia y el número de ellas que están siendo tratadas adecuadamente.

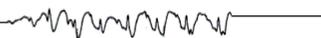
En Latinoamérica existen países con distinto nivel de desarrollo y, además, en un mismo país, pueden también existir notorias diferencias entre áreas urbanas, sub-urbanas, rurales, indígenas, altiplánicas, amazónicas. De esta manera el acceso a un tratamiento adecuado y oportuno para la epilepsia es muy desigual. El carecer de un diagnóstico y las limitaciones al acceso adecuado a los fármacos antiepilépticos constituyen uno de los aspectos más relevantes de la brecha. Puede señalarse el analfabetismo y la falta de una educación sanitaria adecuada como algunas de las causas que inciden en el abandono del tratamiento y en el incumplimiento de las indicaciones médicas. Lógicamente otros aspectos como el estigma, la discriminación, los prejuicios, las creencias erróneas, son factores que contribuyen de forma relevante en la magnitud de la brecha.

Al analizar la disponibilidad de FAEs en los distintos países de Latinoamérica se observan algunas diferencias. La gran mayoría de los países, incluyendo los del Caribe, disponen en el sector público de salud de los fármacos tradicionales, tales como fenobarbital, fenitoína, carbamazepina y ácido valproico, pero la provisión de

estos fármacos suele ser intermitente, y limitada a los niveles secundario y terciario de atención. Otro problema frecuente es la falta de estudios de biodisponibilidad de los medicamentos genéricos utilizados en los sistemas públicos de salud sumado a los reiterados cambios en los proveedores de los mismos (*Informe sobre la Epilepsia en Latinoamérica ILAE, 2008*).

La medición de niveles plasmáticos de fármacos debería ser utilizada para la determinación del cumplimiento, seguimiento de concentración plasmática en manejo del estado epiléptico, evaluación de interacciones entre antiepilépticos y de éstos con otros tipos de fármacos, titulación de compuestos de farmacocinética no predecible, y en el manejo de grupos especiales de pacientes como embarazadas, ancianos, insuficientes renales y con patologías hepáticas. Sin embargo, hoy en día, este monitoreo mantiene vigencia solo en situaciones específicas (*Perucca 2003*).

Por otra parte, la mayor parte de los países de la región carece de provisión sistemática de fármacos de última generación en el sector público de salud y su prescripción es poco frecuente. Además, debe recordarse que los nuevos compuestos no exhiben un beneficio significativamente superior comparado con los agentes tradicionales en cuanto a eficacia en monoterapia, si bien pueden representar mejorías comparadas en relación a calidad de vida a partir de menores frecuencias en aparición de efectos adversos (*Löscher et al 2013*).



En países como Argentina, Brasil y México, algunos de los FAEs de última generación se encuentran disponibles en el arsenal del sector público de atención sanitaria, incluyendo fármacos como lamotrigina, gabapentina, oxycarbamazepina y topiramato. Esta realidad hace posible formular algoritmos de manejo de la farmacorresistencia. En efecto, se encuentra bien documentada la alternativa, tanto en síndromes focales como generalizados que evidencien tendencia farmacorresistente, de utilizar monoterapia con lamotrigina, topiramato y levetiracetam. Asimismo, estos agentes pueden ser utilizados en monoterapia sustitutiva de FAEs clásicos en el caso de necesidad de prevenir efectos adversos inaceptables en situaciones especiales.

Respecto del manejo farmacológico del estado epiléptico (SE), el sector público en algunos países de la región sólo cuenta con diazepam, lorazepam, fenitoína o fenobarbital para uso parenteral, mientras que pocos países están dotados de todos los compuestos establecidos en recientes algoritmos de tratamiento, incluyendo propofol y midazolam para infusión continua. (*Informe sobre la Epilepsia en Latinoamérica ILAE, 2008*).

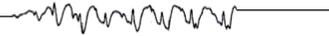
Estos datos alientan la búsqueda de segundos usos, como antiepilépticos, en fármacos ya aprobados por las agencias de control de medicamentos correspondientes a cada país, lo cual podría aportar alternativas económicamente accesibles a los sistemas públicos de salud.

El mayor responsable de la brecha mencionada es la falta de desarrollo de los Sistemas de Salud. En muchos de los países de la región la epilepsia no constituye una prioridad en los programas de salud de los gobiernos. Es importante resaltar la necesidad de hacer un análisis del costo-beneficio que implica la opción de tratar frente a no tratar la epilepsia. Existe además en los servicios de salud una escasez de profesionales especialistas en epilepsia, un número insuficiente de profesionales de salud, provisión insuficiente de FAEs, recursos diagnósticos insuficientes, posibles errores diagnósticos, falta de políticas de salud y de ejecución de planes nacionales de epilepsia. En el año 2009, el gobierno argentino reglamentó la ley de Epilepsia (Ley N° 25404). Esta ley contempla tres aspectos fundamentales para quienes viven con la patología: el derecho a recibir la medicación antiepiléptica en forma gratuita, cuando carecen de cobertura social; la no discriminación laboral, escolar o social; y la implementación de planes de educación permanente sobre epilepsia y campañas de divulgación destinadas a la comunidad en general; a los pacientes y familiares y a los profesionales médicos y no médicos (*Organización Panamericana de la Salud, 2016*).

Aspectos psicosociales

Desde épocas remotas los pacientes con epilepsia fueron temidos y discriminados.

Según datos de la ILAE, IBE y OMS en gran parte de la población de países como Camerún, Liberia, Suazilandia, Senegal, Indonesia, India, Nepal y Uganda

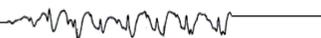


existen conceptos disímiles que identifican a los pacientes epilépticos como poseídos por espíritus, hechizados o portadores de "algo" que se puede contagiar por la saliva. Estudios realizados en China y USA en la década de 1990 mostraron que un 20% de los entrevistados no querían darles empleo a estos pacientes o no querían verse emparentados con ellos. En 17 estados de USA existieron legislaciones que prohibían el matrimonio con estos pacientes (el último estado en variar esta ley lo hizo en 1980). También en este país fue ilegal la entrada a restaurantes, teatros y centros de recreación para los pacientes epilépticos hasta 1970. En la India y China la epilepsia es causa de anulación del matrimonio, mientras que en el Reino Unido no fue aceptado el matrimonio entre epilépticos hasta 1970.

Con el transcurrir del tiempo el mundo y las sociedades fueron evolucionando, pero el tabú de esta enfermedad sigue vigente. La actitud de la población obliga a que las personas con epilepsia la oculten para tener las mismas oportunidades de trabajar, estudiar y de formar una familia.

Lamentablemente, los aspectos psicológicos en la asistencia sanitaria ocupan un papel secundario. Sin embargo, resulta difícil negar la existencia de sufrimiento psíquico y la presencia de alteraciones psicopatológicas en quienes sufren la enfermedad. La epilepsia se ha considerado, hasta hace relativamente poco tiempo, una enfermedad mental. En la novena revisión de la Clasificación Internacional de las Enfermedades (CIE-9) de 1978, la epilepsia ya no aparece como una

enfermedad mental. Hoy en día se considera una enfermedad neurológica (*CIE-9-MC*). Sin embargo, se encuentra asociada a una mayor incidencia de trastornos psiquiátricos como depresión, ansiedad, trastorno de déficit de atención con hiperactividad y trastornos de espectro autista (*Verrotti & Mazzocchetti 2016*).



Referencias:

Alonso-Vanegas M, Cukiert A, Montes J. (2004) Cirugía de la Epilepsia en niños. En: *Epilepsias: Diagnóstico y Tratamiento* MG Campos y AM Kanner (Eds.). Editorial Mediterraneo, Santiago, Buenos Aires, Montevideo:646-664.

Armeno M, Caraballo R, Vaccarezza M, et al. (2014) Consenso nacional sobre dieta cetogénica. *Rev Neurol*, 59:213-23.

Bailey E, Pfeifer H, Thiele E. (2005) Historical review: the use of diet in the treatment of epilepsy. *Epilepsy Behavior*, 6:4-8.

Barañano K, Hartman A. (2008) The Ketogenic Diet: Uses in Epilepsy and Other Neurologic Illnesses. *Current Treatment Options in Neurology*, 10(6):410-419.

Beghi E, Giussani G, Sander JW. (2015) The natural history and prognosis of epilepsy. *Epileptic Disord*, 17(3):243-53.

Ben-Menachem E. (2002) Vagus-nerve stimulation for the treatment of epilepsy. *Lancet Neurol*, 1:477-482

Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, et al. (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51(4):676-685.

Berg A, Scheffer I. (2011) New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century. *Epilepsia*, 52(6):1058-1062.

Bharucha NE, Shorvon SD. (1997) Epidemiology in developing countries. En Engel Jr J, Pedley TA editores. *Epilepsy: A comprehensive textbook*. Philadelphia, Lippincott Raven Press, 105-118.

Campos M, Rabinowicz A, Palmi A, et al. (2004) Protocolo de requerimientos mínimos para el diagnóstico y la cirugía de la epilepsia del lóbulo temporal. Comisión Latinoamericana de Cirugía de la Epilepsia. En: *Epilepsias: Diagnóstico y Tratamiento*. Campos y Kanner (Eds.). Editorial Mediterraneo, Santiago, Buenos Aires, Montevideo: 597-602.

Caraballo RH, Vining E. (2012). Ketogenic diet. *Handb Clin Neurol*, 108:783-93.

Carpio A, Escobar A, Hauser WA. (1998) Cysticercosis and epilepsy: A critical review. *Epilepsia*, 39(10):1025-1040.

Carpio A, Pesantes J. (2004) Neurocisticercosis y epilepsia. En: Campos M., Kanner A. *Epilepsias. Diagnóstico y Tratamiento*. Santiago : Mediterráneo.

CIE-9-MC Calsificación Internacional de Enfermedades. 9 edición. Modificación Clínica. Febrero 2014. Editado por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Secretaría General Técnica. Gobierno de España. Traducción de "The International Classification of Diseases, 9th Revision, Clinical Modification. 1978, Commission on Professional and Hospital Activities, Ann Arbor, Michigan 48705".

Devilat M, Rivera G. (2004) Mortalidad en epilepsia. En: Campos M, Kanner A. Epilepsias Diagnóstico y Tratamiento. Santiago: Mediterráneo.

Engel J. (2001) Finally, a Randomized Controlled Trial of Epilepsy Surgery. *J Med*, 345:365-367.

Englot DJ, Chang EF, Auguste KI. (2011) Vagus nerve stimulation for epilepsy: a metaanalysis of efficacy and predictors of response. *J Neurosurg*, 115(6):1248-1255.

Fisher RS, Van Emde Boas W, Blume W. (2005) Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46:470-72.

Fisher R, Salanova V, Witt T, et al. (2010) Electrical stimulation of the anterior nucleus of thalamus for treatment of refractory epilepsy. *Epilepsia*, 51(5):899-908.

Fischer R, Acevedo C, Arzimanoglou A, et al. (2014) Definición práctica de la epilepsia. *Epilepsia*, 55(4):475-482.

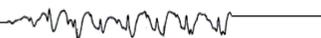
Fisher RS , Cross JH , French JA, et al. (2016) Operational Classification of Seizure Types by the International League Against Epilepsy. En redacción.

Fregni F, Thome-Souza S, Berman F, et al. (2005) Antiepileptic effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with cortical malformations: an EEG and clinical study. *Stereotact Funct Neurosurg*, 83(2-3):57-62.

Fregni F, Otachi PT, Do Valle A, et al. (2006) A randomized clinical trial of repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with refractory epilepsy. *Ann Neurol*, 60(4), 447-455 * First randomized clinical trial about tDCS in epilepsy patients.

Gschwind M, Seeck M. (2016) Transcranial direct-current stimulation as treatment in epilepsy. *Expert Rev Neurother*. En prensa.

Heck CN, King-Stephens D, Massey AD, et al. (2014) Two-year seizure reduction in adults with medically intractable partial onset epilepsy treated with responsive neurostimulation: final results of the RNS System Pivotal trial. *Epilepsia*, 55(3):432-441.



Holmes MD, Silbergeld DL, Drouhard D, et al. (2004) Effect of vagus nerve stimulation on adults with pharmaco-resistant generalized epilepsy syndromes. *Seizure*, 13:340-345.

Informe sobre la epilepsia en Latinoamérica. Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE), Buró Internacional para la Epilepsia (IBE), Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud (OMS) (2008). Coordinador Dr. Carlos Acevedo.

Jette N, Beghi E, Hesdorffer D, et al. (2015) Medina M., Bergen D. ICD coding for epilepsy: Past, present, and future—A report by the International League Against Epilepsy Task Force on ICD codes in epilepsy. *Epilepsia*, 56(3):348-355.

Kossoff EH, Zupec-Kania BA, Amark PE, et al. (2009) Charlie Foundation, Practice Committee of the Child Neurology Society; International Ketogenic Diet Study Group. Optimal clinical management of children receiving the ketogenic diet: recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group. *Epilepsia*, 50:304-17.

Laxer KD, Trinkka E, Hirsch LJ, et al. (2014) The consequences of refractory epilepsy and its treatment. *Epilepsy & Behavior*, 37:59-70.

Lee PR, Kossoff EH. (2011). Dietary treatments for epilepsy: management guidelines for the general practitioner. *Epilepsy Behav*, 21:115-21.

Lefaucheur JP. (2006) Myoclonus and transcranial magnetic stimulation. *Neurophysiol Clin*, 36(5-6):293-297.

Liu S, Yu W, Lü Y. (2016) The causes of new-onset epilepsy and seizures in the elderly. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 12:1425-34.

Löscher W, Schmidt D. (2011) Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: Ways out of the current dilemma. *Epilepsia* 52(4):657-678.

Löscher W, Klitgaard H, Twyman RE, et al. (2013) New avenues for anti epileptic drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*, 12(10):757-76.

Melcon M, Kochen S, Vergara R. (2007) Prevalence and Clinical Features of Epilepsy in Argentina. *Neuroepidemiology*, 28:8-15.

Misawa S, Kuwabara S, Shibuya K, et al. (2005) Low-frequency transcranial magnetic stimulation for epilepsy partialis continua due to cortical dysplasia. *Journal of the Neurological Sciences*, 234(1-2):37-39.

Mishra BR, Sarkar S, Praharaj SK, et al. (2011) Repetitive transcranial magnetic stimulation in psychiatry. *Ann Indian Acad Neurol*, 14(4):245-251.

Newman J, Verdin E. (2014) Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25(1):42-52.

Organización Panamericana de la Salud. <http://www.paho.org/>. (Visitado 15 de Julio de 2016)

Pablos-Sánchez T, Oliveros-Leal L, Núñez-Enamorado N, et al. (2014). Experiencia en el tratamiento con dieta cetogénica de la epilepsia refractaria en la edad pediátrica. *Rev Neurol*, 58:55-62.

Penry JK, Dean JC. (1990) Prevention of intractable partial seizures by intermittent vagal stimulation in humans: Preliminary results. *Epilepsia* 31 (Suppl 2): S40-S43.

Perucca E. (2003) Clinical Evidence for Therapeutics Ranges. Conference at The Seventh Annual AES Antiepileptic Therapy Symposium. American Epilepsy Society Annual Meeting. Boston, MA.

Reséndiz Aparicio JC. (2013) Epidemiología de la epilepsia en América Latina. En: *Epilepsia. Un punto de vista Latinoamericano* Velasco Monroy AL (Ed.) Editorial Alfil. México D.F. México.

Salanova V, Witt T, Worth R, et al. (2015) Long-term efficacy and safety of thalamic stimulation for drug-resistant partial epilepsy. *Neurology*, 84(10):1017-1025.

Sander JW, Sillanpää M. (1997) Natural History and Prognosis. En: *Epilepsy: A Comprehensive textbook*. Engel J, Pedley T. (Eds.). Philadelphia, Lippincott Raven Press, 69-86.

Sander J, Heaney D. (2004) Aspectos económicos de las epilepsias. En: *Epilepsias: Diagnóstico y Tratamiento*. MG Campos y AM Kanner (Eds.). Editorial Mediterraneo, Santiago, Buenos Aires, Montevideo: 875-880.

Semah F, Picot MC, Adam C, et al. (1998) Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor recurrence? *Neurology*, 51:1256-62.

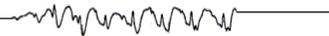
Sharma S, Gulati S, Kalra V, et al. (2009) Seizure control and biochemical profile on the ketogenic diet in young children with refractory epilepsy - Indian experience. *Seizure*, 18:446-449.

Smith SJM. (2005) EEG in the diagnosis, classification, and management of patients with epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76(2):ii2-ii7.

Stafstrom CE, Rho JM. (2012) The ketogenic diet as a treatment paradigm for diverse neurological disorders. *Front Pharmacol*. 3 artículo 59:1-8.

Sun W, Mao W, Meng X, et al. (2012) Low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation for the treatment of refractory partial epilepsy: a controlled clinical study. *Epilepsia*, 53(10):1782-1789.

Tagliabue A, Bertoli S, Trentani C, et al. (2012) Effects of the ketogenic diet on nutritional status, resting energy expenditure, and substrate oxidation in patients



with medically refractory epilepsy: a 6-month prospective observational study. *Clin Nutr*, 31:246-9.

Theodore WH. (2003) Transcranial Magnetic Stimulation in Epilepsy. *Epilepsy Currents*, 3(6):191-197.

Thompson J, Uthman B, Reed R, et al. (2000) Prospective long-term study of vagus nerve stimulation for the treatment of refractory seizures. *Epilepsia*, 41:1195-1200.

Thurman DJ, Beghi E, Begley CE, et al. ILAE Commission on Epidemiology (2011) Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. *Epilepsia*, 7:2-26.

Verrotti A, Mazzocchetti C. (2016) Epilepsy: Beyond seizures – the importance of comorbidities in epilepsy. *Nat Rev Neurol*, 12:559-560.

Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, et al. (2001) Randomized, controlled trial of surgery for temporal lobe epilepsy. *N Engl J Med*, 345:311-318.

Wieser HG, Hajek M, Goos A, et al. (2000) Mesial temporal lobe epilepsy syndrome with hippocampal and amygdala sclerosis. In: Oxbury J, Polkey Ch, Duchowny M. *Intractable Focal Epilepsy*. W.B. Saunders: 131-158.

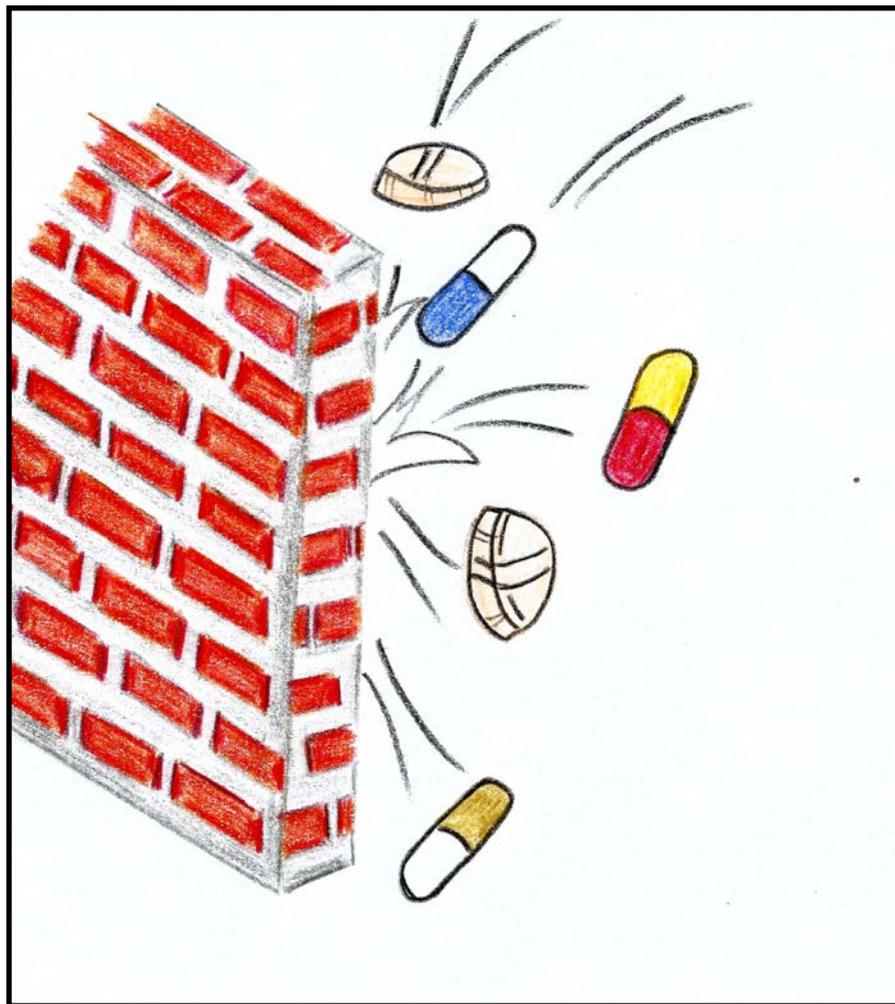
World Health Organization.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/> Updated in February 2016.

Yoon HH, Kwon HL, Mattson RH, et al. (2003) Long-term seizure outcome in patients initially seizure-free after resective epilepsy surgery. *Neurology*, 61:445-450.

CAPÍTULO II

Fármacos Antiepilépticos y Farmacorresistencia.



Capítulo II

Fármacos Antiepilépticos y Farmacorresistencia.

Desde el año 1857 hasta la fecha han sido introducidos al mercado farmacéutico más de 40 fármacos anticonvulsivantes para el tratamiento de los diferentes síndromes epilépticos. Históricamente, los fármacos antiepilépticos (FAEs) han sido clasificados en 3 generaciones. La primera generación, introducida en la práctica clínica entre 1857 y 1958, iniciada con el bromuro de potasio, incluye al fenobarbital, y una variedad de derivados de barbitúricos, incluidos fenitoína, primidona, trimetadiona y etoxusimida, obtenidos por modificaciones estructurales (*Krall et al 1978; Shorvon 2009a*). La segunda generación de antiepilépticos, introducidos entre 1960 y 1975, donde se observan estructuras novedosas, diferentes a los barbitúricos. En este grupo se distinguen la carbamazepina y las benzodiazepinas obtenidas por búsqueda de nuevas estructuras, y el valproato, obtenido por serendipity. Carbamazepina y fenitoína resultaron ser mejor tolerados en el tratamiento de crisis focales respecto de los barbitúricos por ejercer un menor efecto sedante.

Fármacos de primera generación, como fenitoína y fenobarbital, y de segunda generación, como carbamazepina y primidona, han demostrado ser eficaces en el tratamiento de crisis focales e, incluso hoy en día, son ampliamente prescritos en muchas partes del mundo debido a su bajo costo y aceptable actividad (*Löscher &*

Schmidt 2011). Sin embargo, estos fármacos presentan dos grandes desventajas clínicas: Son potentes inductores enzimáticos, lo cual conduce a importantes interacciones farmacológicas, y causan reacciones de hipersensibilidad (*Schmidt & Beyenburg 2009*).

Por otro lado, el valproato, un fármaco eficaz tanto en epilepsia focal como generalizada (*Löscher, 1999*), tiene 3 desventajas: es inhibidor enzimático, causa falla hepática en individuos con cierta predisposición y es teratogénico (*Schmidt & Beyenburg, 2009*).

Recién a partir de la década de los años 80, 20 años después de la introducción del valproato, se introdujeron los fármacos de tercera generación, los cuales surgieron desde el diseño racional de fármacos, dirigidos selectivamente hacia algún mecanismo involucrado en la ocurrencia de las convulsiones epilépticas. En general apuntan a inhibir la neurotransmisión glutamatérgica o a estimular la neurotransmisión gabaérgica. (**Figura 1**) (*Shorvon 2009b*).

El tratamiento con algunos de los FAEs de tercera generación supera algunos de los inconvenientes que presentan los fármacos de primera y segunda generación (interacciones medicamentosas y reacciones de hipersensibilidad). Algunos de ellos también tienen utilidad clínicamente importante para trastornos psiquiátricos y neurológicos diferentes de la epilepsia. Los FAEs de tercera generación amplían, sin duda, las opciones terapéuticas, sin embargo, su eficacia no supera a los de primera y segunda generación. Tal es así que, desde el uso de bromuro de potasio

en 1881 hasta la actualidad, con la incorporación de mas de 40 antiepilépticos disponibles, el porcentaje de pacientes que no responden favorablemente a los fármacos, es decir, que no logran el control de sus crisis, sigue siendo el mismo: el 30% de los pacientes son catalogados como *farmacorresistentes* (**Löschner & Schmidt 2011**).

Hoy en día somos testigos del desarrollo de los FAEs de cuarta generación, los cuales presentan mecanismos de acción novedosos, en muchos de ellos adicionales a los mecanismos tradicionales. Algunos de los nuevos FAEs se exponen en la tabla 1. Estos fármacos se encuentran mayormente en fase preclínica o clínica en la actualidad y han demostrado ser eficaces en modelos animales de convulsiones agudas así como en modelos de epilepsia, los cuales serán desarrollados en el capítulo 3.



Figura 1: Mecanismo de acción de fármacos antiepilépticos tradicionales.

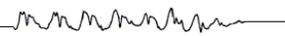
Entre los mecanismos que se han demostrado en los nuevos compuestos se destacan la intervención en el metabolismo de hidratos de carbono, la inhibición de la inflamación por parte del sistema inmune (estrechamente relacionada con la actividad epileptogénica y la farmacorresistencia), el agonismo o antagonismo de

receptores distintos de los involucrados en la neurotransmisión gabaérgica o glutamatérgica (como serotonina, galanina, adenosina, histamina, melatonina), inhibición de la neurotransmisión eléctrica por desacople de uniones gap, entre otros (*Bialer et al 2013, 2015*).

En esta línea, el presente trabajo de tesis pretende aportar herramientas para ser utilizadas en la búsqueda de nuevos fármacos antiepilépticos, con el objetivo de superar las barreras de la farmacorresistencia y/o disminuir efectos no deseados.

Definición de farmacorresistencia

El concepto de epilepsia resistente a los medicamentos (a menudo utilizado indistintamente como "medicamento intratable/refractaria" o "farmacorresistente") parece poder explicarse por sí mismo de manera intuitiva por lo que, por muchos años no se ha desarrollado una definición precisa. Esto ha dado lugar a diversos criterios utilizados por diferentes médicos e investigadores, o incluso la falta de criterios explícitos en algunos casos, lo que hace difícil comparar los resultados entre los estudios y formular recomendaciones prácticas.



Fármaco	Mecanismo de acción	Fase de evaluación
2-desoxi-D-glucosa	Inhibición de hexokinasa	Fase preclínica
Ganaxolona	Activación directa del Rc GABAa	Fase clínica
Nax 810-2	Agonista GalR2	Fase preclínica
Perampanel	Antagonista AMPA y NMDA	Comercializado
Tonabersat	Desacople de uniones gap	Fase clínica
VX-765	Inhibidor de enzima convertidora de caspasa 1	Fase preclínica
Canabidiol	Inhibición de recaptación de adenosina Modulación de movilización de calcio intracelular Acción sobre canales TRP (Transient Receptor Potential)	Fase clínica
Everolimus	Inhibición de proteína mTOR	Fase clínica
Levetiracetam / Brivaracetam	Unión a proteínas SV2A	Comercializado
Huperzina A	Inhibidor de acetilcolinesterasa	Fase preclínica
Minociclina	Inhibición de actividad de MMPs, iNOS y COX-2.	Fase clínica
Pitolisant	Antagonista del receptor H3	Fase preclínica
PXR0023	Agonista 5HT 1A	Fase clínica
VLB-01	Agonista NQO-2 (Rc de Melatonina)	Fase clínica
YKP3089	Canales de Na, bloqueo selectivo del estado inactivado - preferencialmente INaP	Fase clínica

Tabla 1: Descripción del mecanismo de acción y fase de evaluación de algunos de los FAEs de cuarta generación.

En respuesta a esta situación, en el año 2009, la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) nombró un grupo de trabajo bajo la Comisión de Estrategias Terapéuticas para formular una propuesta de definición de consenso de la epilepsia resistente a fármacos.

Sobre la base de una deliberación cuidadosa de la evidencia disponible, y para fines operativos, se propuso la siguiente definición:

“La epilepsia resistente a fármacos puede ser definida como el fracaso del tratamiento con dos fármacos antiepilépticos bien tolerados y apropiadamente elegidos y administrados (ya sea como monoterapia o en combinación) para lograr la ausencia de crisis sostenidas.”

Se entiende por “ausencia de crisis sostenidas” o “paciente libre de crisis” a la ausencia de cualquier tipo de crisis, incluidas las auras. El paciente deberá pasar 3 veces el tiempo del intervalo entre 2 crisis antes del tratamiento antiepiléptico o más de 12 meses (el tiempo que sea mayor) sin presentar convulsiones para ser considerado “libre de crisis” y por lo tanto sensible a los fármacos antiepilépticos (*Kwan et al 2010*).

Es importante poder diferenciar una escasa respuesta al tratamiento con un diagnóstico incorrecto del síndrome epiléptico. Por ejemplo: si una epilepsia causada por mutación en el gen del transportador de glucosa (GLUT 1) es tratada

con valproato, las convulsiones empeorarán, mientras que la sustitución de la glucosa con dieta cetogénica aliviaría las convulsiones y el déficit de glucosa en el sistema nervioso central. De la misma manera, si se tratara una epilepsia genética o idiopática como la epilepsia mioclónica juvenil o el síndrome de Dravet con bloqueantes de canales de sodio, las crisis podrían ser agravadas, ya que se ha asociado estos tipos de epilepsia a mutaciones en los canales de sodio (*Martínez Juárez et al 2013*).

Mecanismos implicados en la farmacorresistencia

La resistencia a fármacos refleja un fenómeno multifactorial muy complejo. Puede ser intrínseca o adquirida, es decir que puede ser propia del síndrome epiléptico y existir desde la primera convulsión o puede ser desarrollada como resultado del progreso de la enfermedad o incluso del mismo tratamiento farmacológico.

Se han postulado hipótesis generales para explicar por que un síndrome epiléptico es farmacorresistente. Algunas de ellas proponen mecanismos asociados.

1- Hipótesis de la severidad intrínseca

Existen factores de riesgo propios de los síndromes epilépticos, que son considerados importantes para el desarrollo del fenotipo resistente. En la actualidad, no existe un acuerdo en cuanto a los marcadores clínicos más representativos de la gravedad de la epilepsia. La misma podría ser

estimada a través de diferentes factores, incluyendo el tipo y la frecuencia de las convulsiones, impacto en la calidad de vida, discapacidad, enfermedades concomitantes, la letalidad, la electroencefalografía o por varios biomarcadores, incluyendo medidas de lesión neuronal (*Rogawski 2013*).

2- Hipótesis de los blancos farmacológicos

Una vez que los fármacos logran acceder al sistema nervioso central, deben unirse a uno o más blancos para ejercer el efecto deseado.

Desde el punto de vista farmacodinámico la resistencia puede darse por alteraciones en la estructura, función, cantidad o localización de los blancos moleculares. Un ejemplo es el incremento en la expresión de canales de calcio tipo T en neuronas hipocámpales (*Su et al 2002*) o en neuronas talámicas implicadas en la generación de descargas de punta onda asociadas a crisis de ausencia (*Huguenard 2002*). Este mecanismo de resistencia se aplica también a canales de potasio (*Remy & Beck 2006*). Dichas alteraciones están asociadas a la actividad convulsiva, la cual puede causar múltiples modificaciones post-traduccionales en proteínas que forman canales iónicos, tales como trastornos en el transporte, señalización, forforilación o glicosilación, alterando el número de canales funcionales (*Bernard et al 2004; Chen et al 2001; Su et al 2002*).

Cambios similares fueron observados en receptores GABA_A, por reducción de la expresión de subunidades α_1 e incremento de la subunidad α_4 , reduciendo la afinidad de GABA y benzodiazepinas por el receptor (*Brooks-Kayal et al 1998*).

También se han descrito numerosos cambios en la expresión de subunidades de canales de sodio en modelos de convulsión y epilepsia, así como en pacientes epilépticos (*Bartolomei et al 1997; Gastaldi et al 1998; Aronica et al 2001; Whitaker et al 2001; Ellerkmann et al 2003*), sugiriendo que las convulsiones, o el proceso epileptogénico, podrían alterar los blancos farmacológicos. Un ejemplo es la relación entre la pérdida del efecto de fenitoína y la mutación de la subunidad accesoria β_1 (*Lucas et al 2005*).

La principal objeción a la hipótesis de los blancos farmacológicos es que, como se ha mencionado, los FAEs están asociados a diferentes mecanismos de acción. Incluso aquellos FAEs que comparten un mecanismo común (por ejemplo, modulación alostérica del receptor GABA) con frecuencia se unen a diferentes sitios del mismo receptor. Por lo tanto, esta hipótesis por sí misma sería satisfactoria solamente para explicar el fenómeno de la resistencia a múltiples fármacos cuando los mismos comparten su mecanismo de acción (*Talevi & Bruno Blanch 2013*).

3- Hipótesis de los transportadores

Luego de ser administrados, los fármacos antiepilépticos deben cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) y permanecer en el sitio de acción. La hipótesis de los transportadores plantea la sobreexpresión de transportadores de eflujo, tanto en BHE como en tejidos y órganos que participan en el metabolismo, y en el propio foco epiléptico. Esta situación puede ser una de las causas responsables de la disminución de la biodisponibilidad del fármaco, lo que hace que sea insuficiente para ejercer el efecto deseado (*Potschka 2010a*). Esta hipótesis será desarrollada con mayor detalle más adelante debido a que sustenta el presente trabajo de tesis.

4- Hipótesis de las variaciones genéticas

Esta hipótesis se encuentra íntimamente relacionada con las anteriores y postula que las alteraciones en distintos elementos vinculados a la absorción, distribución, metabolización y eliminación de fármacos, así como en los propios blancos terapéuticos pueden estar dadas por variaciones genéticas (*Löscher et al 2009*). Se ha encontrado asociación entre la resistencia a FAEs y distintos polimorfismos, por ejemplo, para genes que codifican blancos terapéuticos (como el gen SCN1A que codifica para la subunidad α_1 del canal de sodio), transportadores de drogas (como el gen ABCB1), enzimas metabolizadoras de fármacos (como CYP2C9, CYP2C19),

y antígenos leucocitarios humanos (HLA) (*Skjei et al 2015; Verrotti et al 2015; Berghuis et al 2015; Yu et al 2015; Lv et al 2015; Zhou et al 2015; Liu et al 2015; Li H et al 2015; Li SX et al 2015; Keangpraphun et al 2015; Manna et al 2015; Ma et al 2014*)

La hipótesis de las variaciones genéticas suma otro punto de interés a los mencionados anteriormente: las enzimas metabolizadoras de fármacos. La variabilidad interindividual en las enzimas que participan en el metabolismo de los fármacos puede definir el éxito o fracaso de la farmacoterapia, así como su tolerabilidad y seguridad.

5- Hipótesis de las redes neuronales

La hipótesis de las redes neuronales sugiere que, bajo una influencia genética y micro ambiental, los episodios recurrentes con excesiva actividad neuronal pueden inducir degeneración y necrosis neuronal, gliosis, ramificaciones axonales, reorganización sináptica y la remodelación de la red neural. Debido al “mensaje de error” que reciben las neuronas residuales del cerebro lesionado por las convulsiones, éstas se desvían hacia una dirección no fisiológica y forman conexiones anormales. Estas nuevas redes neuronales originadas bajo condiciones patológicas pueden ser el origen de descargas epileptiformes. La formación de redes neuronales anormales no sólo evita el efecto inhibitor del sistema antiepiléptico

endógeno, sino que también impide que los fármacos antiepilépticos tradicionales ejerzan su efecto adecuadamente (*Fang et al 2011*).

La hipótesis de las redes neuronales tiene también algunas limitaciones: las alteraciones de la plasticidad del cerebro no son exclusivas de la epilepsia refractaria, también están presentes en epilepsias que son controladas por los FAEs; de hecho, forman parte del proceso epileptogénico (*Banerjee et al 2014*).

Dado que la base biológica de la farmacorresistencia es multifactorial y varía de un paciente a otro, ninguna hipótesis por sí sola resulta adecuada para explicar los mecanismos implicados en todos los pacientes.

Ha sido propuesto que diferentes mecanismos de resistencia pueden ser aplicables a diferentes fármacos. Por ejemplo, la hipótesis de los blancos moleculares es más relevante para FAEs que no son sustratos de transportadores de eflujo, mientras que la hipótesis de los transportadores puede aplicar para la resistencia a FAEs que sí lo son.

A continuación, abordaremos la hipótesis de los transportadores con mayor detalle.

Transportadores ABC

Los transportadores ABC (por su sigla en inglés *ATP Binding Cassette*) son proteínas integrales de membrana que utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para transportar sustratos a través de las membranas celulares en todas las especies de mamíferos. Los genes ABC pueden dividirse en 7 familias de acuerdo a la homología de aminoácidos: ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCDE, ABCF, y ABCG. La glicoproteína P (Pgp), la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) y la familia de las proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRPs), que son los productos codificados por los genes ABCB1, ABCG2 y ABCCs respectivamente, son las más expresadas en el humano y tienen particular relevancia clínica por su amplia especificidad de sustrato (que dio lugar a la expresión "transportadores de múltiples fármacos"), incluyendo una variedad de fármacos de uso clínico estructuralmente diferentes (*Higgins 1992; Vasiliou et al 2009; Fletcher et al 2010*). Estas proteínas se expresan normalmente en tejidos con función excretora, como intestino delgado, hígado y riñón, y en las barreras de sangre-tejido, como barrera hematoencefálica, barrera hémato-testicular y placenta (fig.2), limitando la llegada del fármaco al torrente sanguíneo después de la administración oral, promoviendo la eliminación del fármaco en la bilis y la orina, y limitando la penetración del fármaco en los órganos blanco, tales como el cerebro, a la vez que promueven su extrusión hacia el torrente sanguíneo (*Cordon-Cardo et al 1990; Vasiliou et al 2009*)

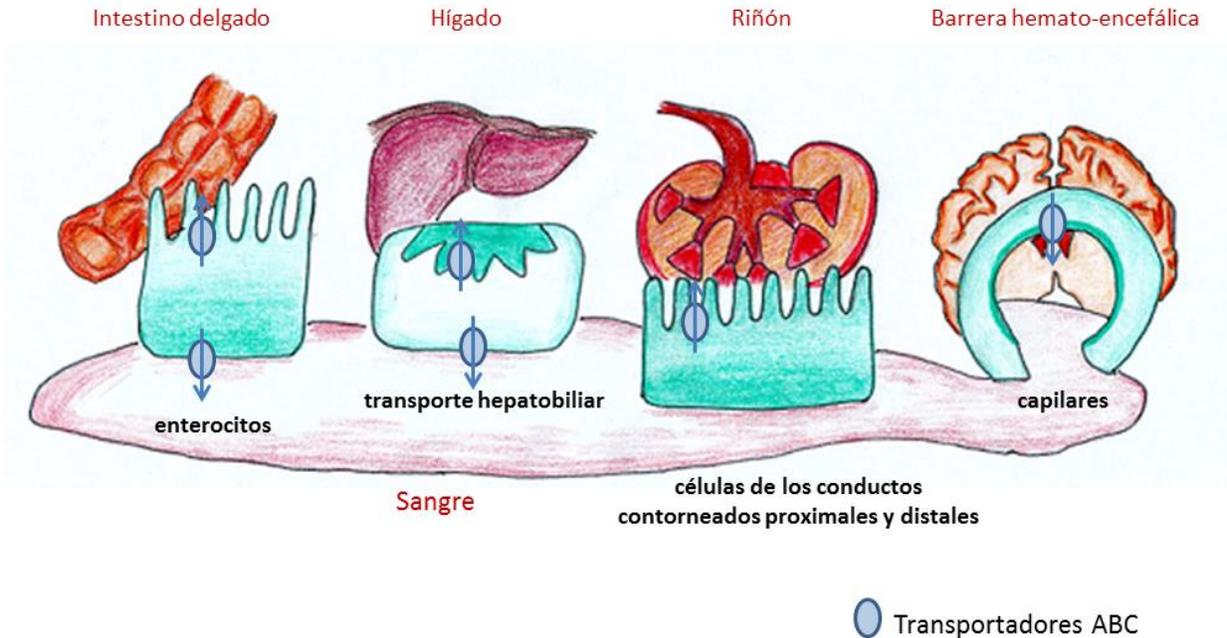


Figura 2: Expresión de transportadores ABC en diferentes tejidos.

Por esta misma razón, la expresión constitutiva de estas proteínas, junto con enzimas metabolizadoras, es un importante mecanismo de protección contra la potencial toxicidad de compuestos xenobióticos y endógenos.

La actividad de las proteínas ABC parece ser cooperativa, debido a que existe una superposición parcial de la especificidad de sustrato entre diferentes miembros de la superfamilia sumada a patrones de co-expresión y co-localización (*Lin et al 2013; Tiwari et al 2013; Vlaming et al 2009; Chen et al 2009; Bauer et al 2013*). Ha sido demostrado, por ejemplo, que Pgp y BCRP forman un sistema cooperativo de flujo de salida de fármacos de manera que el acceso al cerebro de sustratos duales es disminuido sólo cuando la función de ambos transportadores

es bloqueada o regulada hacia abajo genética o químicamente (*Kodaira H et al 2010*).

Expresión de proteínas de transporte en BHE

La BHE es una barrera física y bioquímica entre el cerebro y el sistema circulatorio que sirve para regular y proteger el microambiente cerebral (*Pardridge, 1999*). La funcionalidad de la BHE se basa en la existencia de una permeabilidad muy restringida del endotelio vascular del SNC, que es permeable solo al paso de solutos plasmáticos, tales como el agua, gases como el oxígeno y el CO₂ y determinadas moléculas liposolubles muy pequeñas (menores de 400-600 Da de peso molecular), impidiendo el paso de las moléculas orgánicas de mayor tamaño y de moléculas hidrofílicas, que deben hacerlo a través de sistemas de transporte específicos y finamente regulados.

La BHE está compuesta por una monocapa de células endoteliales capilares. Los capilares cerebrales se distinguen por la falta de fenestraciones, baja actividad pinocítica y la presencia de uniones estrechas entre las células endoteliales adyacentes, responsables de la baja permeabilidad. Además, están rodeados por una matriz extracelular (membrana basal), pericitos, pies de astrocitos y neuronas, que conjuntamente configuran la unidad neurovascular. Las células endoteliales de la BHE expresan numerosos transportadores de membrana ABC (MRP1, 2, 4 y 5, Pgp y BCRP) involucrados en el influjo y eflujo de varios sustratos esenciales como electrolitos, nucleósidos, aminoácidos y glucosa, siendo rutas de salida para

desechos metabólicos potencialmente tóxicos y macromoléculas (*Lee et al 2001; Löscher & Potschka 2005a; Bernacki et al 2008*).

Pgp fue el primer transportador ABC detectado en células endoteliales de la BHE humana en 1989 (*Thiebaut et al 1989; Cordon-Cardo et al 1989*). Luego fue localizada en BHE de otras especies, inclusive en roedores, sugiriendo que podría servir como un mecanismo general de defensa en la BHE de mamíferos, protegiendo al cerebro de intoxicación por compuestos lipofílicos potencialmente dañinos procedentes de fuentes naturales y otros xenobióticos lipofílicos que de otro modo podrían penetrar la BHE por difusión simple sin ningún tipo de limitación (*Schinkel 1999*). La localización exacta de la Pgp en la BHE ha sido objeto de numerosas investigaciones. Hay dos tipos de Pgp humana: tipo 1 (expresada en BHE) y tipo 2 (la cual se expresa en la membrana de los canalículos de los hepatocitos y funciona como una fosfatidilcolina translocasa) (*Demeule et al 2002*). En roedores, la Pgp tipo 1 es codificada por dos genes (*mdr1a* y *mdr1b*) (*Demeule et al 2002*). La especificidad de la Pgp codificada por estos dos genes es diferente (pero en parte superpuesta) y los dos genes se expresan juntos de manera similar que el gen MDR1 humano, que codifica para Pgp tipo 1, lo cual sugiere que en el ratón, *mdr1a* y *mdr1b* cumplen, entre los dos, la función de la Pgp tipo 1 humana (*Schinkel 1999*). Si bien ambas están presentes en el cerebro de los roedores, *mdr1a* está localizada en los capilares cerebrales de ratas y ratones, mientras que *mdr1b* se encuentra presente sólo en parénquima cerebral (*Demeule*

et al 2002). A nivel subcelular, se ha demostrado que Pgp es principalmente expresada en la membrana luminal (apical) de las células endoteliales de capilares cerebrales en mamíferos, incluidos los humanos (*Schinkel & Jonker 2003; Sun et al 2003; Demeule et al 2002*). De esta manera, los fármacos sustratos de Pgp que entran en las células endoteliales desde la sangre se bombean inmediatamente de nuevo a la sangre. Como consecuencia, la penetración de estos compuestos puede ser drásticamente disminuida (*Schinkel 1999*). En ausencia de Pgp en la BHE, en modelos de ratones knock-out para Pgp, la penetración de fármacos sustratos de Pgp en el cerebro puede aumentar de 10 a 100 veces, con consecuencias a veces dramáticas respecto a la toxicidad de compuestos (*Schinkel & Jonker 2003*). Además, el bloqueo de la Pgp por administración de inhibidores aumenta significativamente la concentración cerebral de fármacos sustratos de Pgp (*Sawchuk & Elmquist 2000; Löscher & Potschka 2002*).

Löscher y colaboradores demostraron que, bajo condiciones fisiológicas, Pgp es expresada predominantemente en células endoteliales, pero también en astrocitos perivasculares y parenquimales, aunque en menor medida (*Löscher & Potschka 2005b*). Las convulsiones inducen una sobreexpresión de Pgp en los diferentes tipos de células y, adicionalmente, inducen la expresión de Pgp en neuronas (*Volk et al 2004a, b; 2005*). La expresión de Pgp en los cuatro tipos de células diferentes sugiere que la función de Pgp en el cerebro podría ser más compleja de los que originalmente se creía.

En contraste con Pgp, los datos de otros transportadores ABC en la BHE son más limitados (*Schinkel & Jonker 2003; Sun et al 2003*). La familia ABCC (incluidos MRP1-9) actúa como un transportador de aniones orgánicos, aunque también puede transportar drogas orgánicas neutras (*Borst et al 2000*). Como consecuencia, Pgp y MRPs tienen especificidad de sustratos sobrepuesta, de manera que varios fármacos son sustratos de ambas familias de transportadores (*Schinkel & Jonker 2003; Borst et al 2000; Seelig et al 2000*). Tal como sucede con Pgp, MRPs son localizadas normalmente en varios tejidos, incluidos BHE y barrera hemato-cerebroespinal. Algunas MRPs, como MRP2, se localizan en las membranas celulares apicales de los tejidos mientras otras MRPs, como MRP1, MRP3 y MRP5 se ubican en la membrana basolateral (Fig. 3) (*Borst et al 2000*). Por otro lado, en cerebro de rata, MRP1 está presente en astrocitos en mayor medida que en células endoteliales de capilares cerebrales (*Declèves et al 2000*). Además, se encontró una alta expresión de MRP1, MRP4 y MRP5 en células epiteliales de plexos coroideos que forman la barrera hemato-cerebroespinal (*Rao et al 1999*) mientras que MRP2 y MRP3 (al igual que mdr1a y mdr1b) se expresan sólo en niveles muy bajos en estas células (*Choudhuri et al 2003*).

La distribución de BCRP muestra una notable colocalización con Pgp. BCRP ha sido detectada en células endoteliales de capilares de ratones (*Cisternino et al 2004*) y humanos, principalmente en la superficie luminal (*Cooray et al 2002*) con mayor expresión que Pgp o MRP1 en BHE (*Eisenblatter et al 2003*). Resulta

interesante el dato de que ratones *mdr1a* knockout tuvieron cerca de 3 veces más BCRP en microvasos cerebrales que animales normales, indicando una sobrerregulación de BCRP para compensar la pérdida de Pgp en BHE (Cisternino et al 2004).

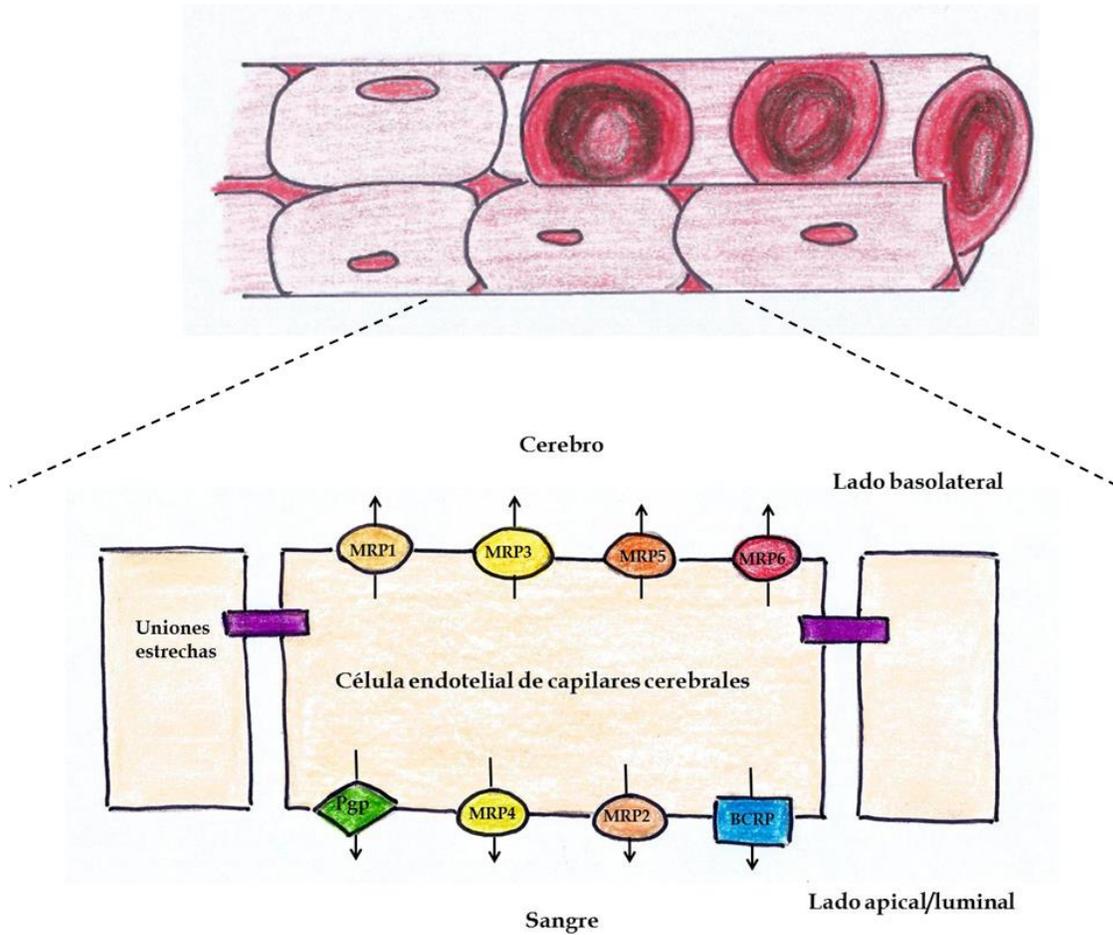


Figura 3: Localización de transportadores ABC en las células endoteliales de capilares cerebrales.

Sobreexpresión de transportadores ABC

Ciertas circunstancias provocan una mayor expresión y/o incremento de la función de los transportadores ABC, exacerbando la expulsión activa de fármacos funcionalmente no relacionados fuera de la célula. Como consecuencia no se alcanzan niveles terapéuticos de los fármacos en el sitio de acción y, por lo tanto, se observa una falta de respuesta al tratamiento. Por este motivo se asocia a dichos transportadores la aparición de "resistencia a múltiples fármacos" (MDR), que desempeña un papel crucial en el fracaso de los tratamientos contra tumores, enfermedades infecciosas y varios trastornos cerebrales (*Lazarowski et al 2007*).

Tishler y colaboradores fueron los primeros en reportar un marcado incremento en la expresión cerebral de Pgp en astrocitos y capilares cerebrales en la mayoría de los pacientes con epilepsia parcial fármacorresistente (*Tishler et al 1995*). Estos autores propusieron que Pgp juega un rol clínicamente significativo por limitar el acceso de los FAEs al parénquima cerebral. Subsecuentemente otros investigadores demostraron que, además de Pgp, varias MRPs, son sobreexpresadas en células endoteliales de los capilares cerebrales y/o astrocitos de pacientes farmacorresistentes y modelos experimentales. Respecto a la BCRP se ha reportado que no hay sobreexpresión en pacientes con epilepsia (*Sisodiya et al 2003*) aunque se ha visto una mayor expresión en animales epilépticos en el modelo de estimulación eléctrica de amígdala basolateral (modelo BLA) (*van Vliet et al 2005*) (tabla 2). En algunos de estos estudios, la sobreexpresión en astrocitos se vio con mayor intensidad alrededor de los vasos sanguíneos. En vista de datos que

indican que la función de barrera endotelial de la BHE se interrumpe transitoriamente durante las convulsiones (*Duncan & Todd 1991*), la sobreexpresión de transportadores ABC en los pies chupadores de astrocitos que cubren los vasos sanguíneos puede representar una segunda barrera de protección (*Sisodiya et al 2002*). En la figura 4 se ilustra comparativamente la expresión normal y la sobreexpresión de transportadores ABC en la BHE.

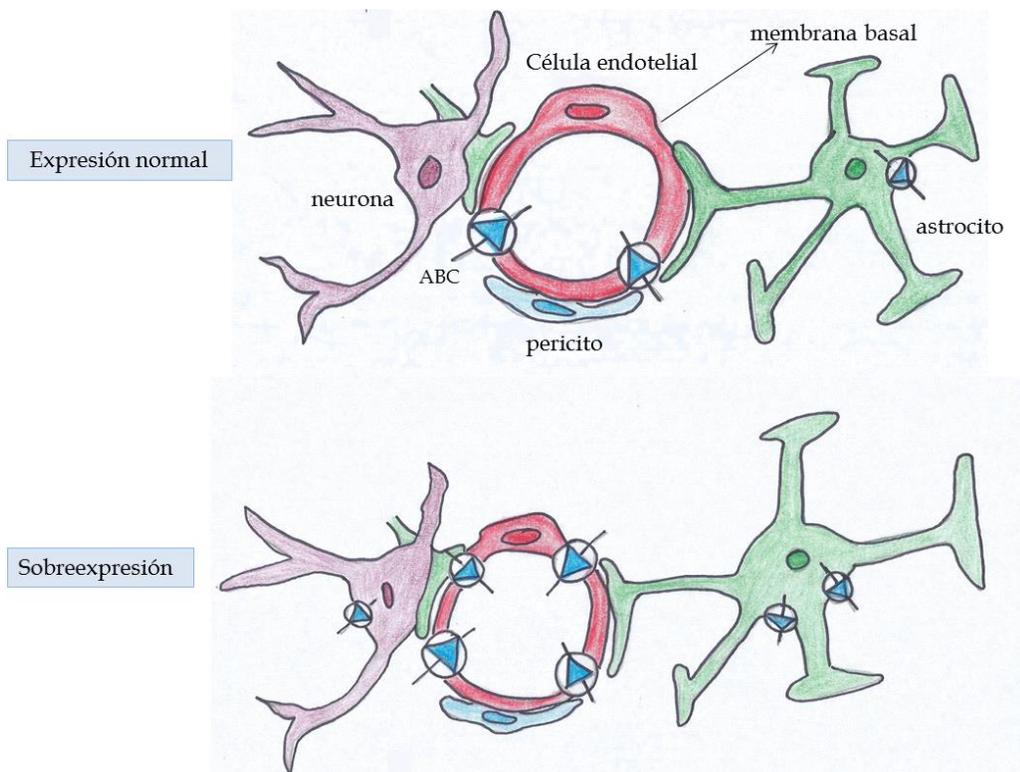


Figura 4: Expresión de transportadores ABC en BHE en condiciones fisiológicas y patológicas.

La sobreexpresión de Pgp y MRPs en tejido cerebral epileptogénico de pacientes con epilepsia intratable podría ser intrínseca (constitutiva) o adquirida (por ejemplo, como consecuencia de la epilepsia, de convulsiones no controladas,

del tratamiento crónico con FAEs o de una combinación de esos factores) (Miller 2010). Además, la sobreexpresión no es necesariamente restringida al cerebro, podría también ocurrir en otros tejidos, como intestino delgado, donde la Pgp oficia como barrera contra la entrada de los fármacos desde la luz intestinal hacia el torrente sanguíneo, lo que limita su biodisponibilidad oral (Fromm 2000).

Transportador ABC	Proveniencia del tejido epileptogénico	Células endoteliales de capilares cerebrales	Astrocitos	Neuronas	Referencia
Pgp	Pacientes	+	+	+	Tishler et al 1995; Sisodiya et al 1999,2002; Dombrowski et al 2001; Aronica et al 2003,2004.
	Rata (modelo kainato)	+	+	+	Volk et al 2004a,b; Zhang et al 1999; Seegers et al 2002.
	Rata (pilocarpina)	nr	+	+	Volk et al 2004a.
	Rata (kindling)	+	nr	nr	Volk et al 2004b.
MRP1	Pacientes	nr	+	+	Sisodiya et al 1999, 2001; Dombrowski et al 2001; Aronica et al 2003.
MRP2	Pacientes	+	+	nr	Dombrowski et al 2001; Aronica et al 2004.
MRP3	Pacientes	-	nr	nr	Dombrowski et al .
MRP5	Pacientes	+	nr	nr	Dombrowski et al 2001.
BCRP	Pacientes	-	-	-	Sisodiya et al 2003; Aronica et al 2005.
	Rata (modelo BLA)	-	+	-	van Vliet et al 2005.

Tabla 2: Sobreexpresión de transportadores ABC en tejido epiléptico.
nr= no reportado. Tabla adaptada de Löscher & Potschka 2005b.

- **Sobreexpresión de transportadores ABC por exposición a xenobióticos.**

En las barreras periféricas y tejidos excretorios, las señales desde varios receptores intracelulares activados por ligando regulan la expresión tanto de enzimas metabolizadoras de xenobióticos como de transportadores excretorios. De esta manera, los receptores nucleares de pregnano-X (PXR) y

de androstano (CAR) expresados en células endoteliales de capilares cerebrales de roedores y humanos (*Bauer et al 2004; Dauchy et al 2008*) se consideran una parte importante de la primera línea de defensa contra sustancias tóxicas, tanto endógenas como xenobióticas (*Urquhart et al 2007*).

Ambos receptores son activados por ligandos endógenos y por numerosos fármacos, entre los que se encuentran varios FAEs, muchos de ellos sustratos de las enzimas y transportadores que los propios receptores regulan (*Bauer et al 2008a*). Es probable que la expresión de transportadores en barreras y tejidos excretores se encuentre inducida en mayor proporción en pacientes que reciben un tratamiento farmacológico que en el común de la población (*Miller 2010*).

- **Sobreexpresión de transportadores ABC por crisis repetidas.**

La liberación excesiva de glutamato durante las crisis epilépticas y su acción mediante la vía de señalización del receptor NMDA contribuyen significativamente a la fisiopatología de la epilepsia. Bauer y colaboradores han demostrado el aumento de la expresión de Pgp a través de la activación de la vía de señalización glutamato / receptor NMDA / COX-2 en capilares cerebrales aislados activados por una alta concentración de glutamato extracelular (fig. 5) (*Bauer et al 2008b; Zhu et al 2004*). El tratamiento con inhibidores de COX-2 produce un decremento de la expresión de Pgp hasta

niveles equivalentes a la condición control además de la reversión del fenotipo resistente en el modelo de BLA (*Schlichtiger et al 2010*). También se ha reportado la inhibición de la sobreexpresión de Pgp mediante tratamiento con inhibidores de COX-2 luego del *status epilepticus* (SE) inducido por Pilocarpina (*Zibell et al 2009*) y en capilares aislados de pacientes epilépticos, expuestos a estos agentes (*Avemary et al 2013*).

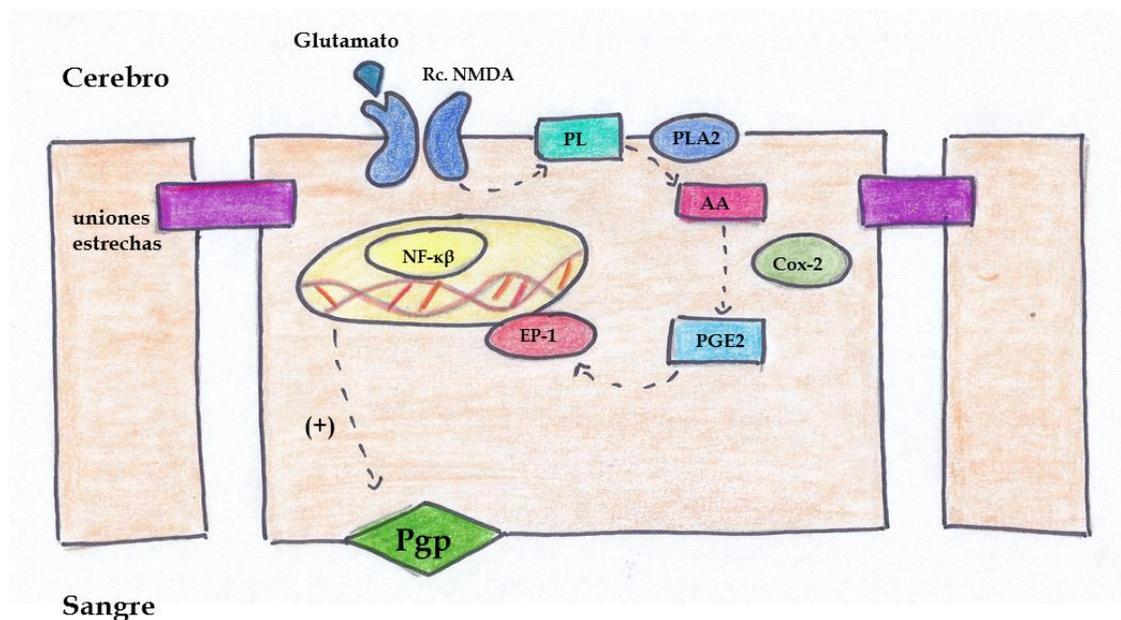


Figura 5: Aumento de la expresión de Pgp a través de la activación de la vía de señalización glutamato /receptor NMDA / COX-2.

Este mecanismo confirma la hipótesis de la severidad intrínseca debido a que crisis no controladas o de alta severidad podrían predisponer a la farmacorresistencia.

- **Sobreexpresión de transportadores ABC por neuroinflamación.**

La neuroinflamación se caracteriza por activación de la microglia, astrocitos y células endoteliales de la BHE, la infiltración de proteínas plasmáticas y células del sistema inmune y el aumento de una matriz de mediadores pro- y anti-inflamatorios (*Marchi et al 2014; Janigro 2012*). Estas alteraciones celulares y bioquímicas dentro del cerebro son comúnmente observadas en pacientes epilépticos y en modelos experimentales de epilepsia (*Aronica & Crino 2011; Marchi et al 2014; Vezzani & Granata 2005; Vezzani & Baram 2007; Riazi et al 2010; Choi et al 2009*). Además, se ha demostrado que las convulsiones también pueden aumentar la permeabilidad de la BHE, lo cual contribuye a intensificar y perpetuar la neuroinflamación por extravasación de leucocitos y moléculas inflamatorias desde los vasos sanguíneos hacia el parénquima cerebral (*Marchi et al 2014*). Por otro lado, según extensa evidencia clínica y experimental, la neuroinflamación afecta la severidad y recurrencia de las crisis convulsivas. Por lo tanto, la neuroinflamación que se produce como consecuencia de la epilepsia puede a su vez puede provocar o facilitar la ocurrencia de nuevas crisis (*van Vliet et al 2012; Vezzani & Granata 2005; Ludvigsson et al 2012; Lang et al 2003; Iyer et al 2010; Iffland et al 2013; Bien et al 2005; Dey et al 2016*).

Estudios *in vivo* muestran una respuesta a señales proinflamatorias (LPS; TNF- α ; ET-1) con una pérdida inicial de la actividad de Pgp, sin cambios en la expresión, seguida de la inducción de la actividad y expresión de la Pgp respecto de los niveles normales, luego de la exposición a largo plazo a TNF- α , (Roberts & Goralski 2008). Las vías de señalización responsables de estos efectos han sido mapeadas en capilares aislados de cerebro de rata. Las cascadas intracelulares incluyen la activación de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y la proteína kinasa C β II (PKC β II), y la translocación del factor de transcripción NF- κ B en el núcleo (fig. 6).

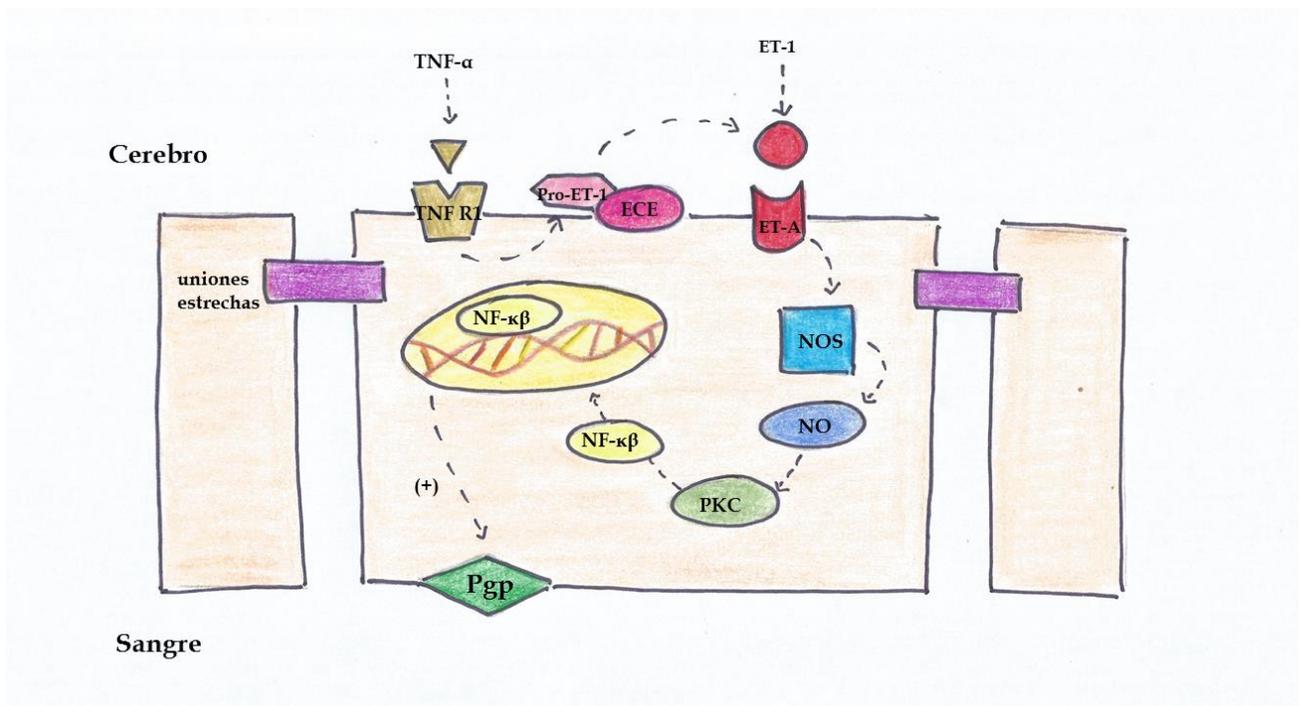


Figura 6: Aumento de la expresión de Pgp inducida por señales proinflamatorias.

En algunos casos, también se ve alterada la expresión de otros transportadores ABC, pero no está claro si es la misma cascada la que conduce a estos cambios (*Miller 2010*).

Estrategias para el tratamiento de epilepsia farmacorresistente por sobreexpresión de transportadores ABC

Varios de los FAEs utilizados en la clínica, incluidos fenitoína, fenobarbital, carbamazepina, lamotrigina y felbamato son sustratos de una o más proteínas ABC (*Löscher & Potschka 2002; Luna-Tortos et al 2008*). Con el objetivo de evitar la resistencia mediada por este mecanismo se ha propuesto la co-administración de FAEs con inhibidores de transportadores ABC. Brandt y colaboradores han demostrado la reversión completa de la farmacorresistencia en animales resistentes a fenobarbital mediante un tratamiento por combinación de fenobarbital con un inhibidor selectivo de Pgp (Tariquidar) (*Brandt et al 2006*). Resultados similares fueron reportados en animales resistentes a fenitoína (*Van Vliet et al 2006*). Algunos casos de pacientes farmacorresistentes también han mostrado una mejora al recibir FAEs junto con el inhibidor de Pgp verapamil (*Summers et al 2004; Iannetti et al 2005, 2009*). Sin embargo, la sobreexpresión de Pgp no fue confirmada, ni su inhibición validada, en estos casos (*Robey et al 2008*).

El uso de bloqueantes de Pgp en cáncer farmacorresistente ha sido un enfoque de investigación llevado a cabo por un gran número de investigadores básicos y clínicos desde los años 90 (*Bates et al 2002*). Inhibidores usados en la

clínica incluyen verapamilo, quinidina, ciclosporina, PSC-833 (valsopodar), GF120918 (elacridar), y XR9576 (tariquidar). Sin embargo, los ensayos clínicos de inhibidores de Pgp co-administrados con citostáticos sustratos de Pgp en pacientes con tumores sólidos y neoplasias hematológicas han resultado decepcionantes. Si bien los ensayos de fase II fueron prometedores, los de fase III resultaron negativos, teniendo que detener los estudios debido a toxicidad inaceptable. Estos resultados negativos han puesto en duda la estrategia de superación de la resistencia a fármacos mediante el uso de inhibidores de Pgp (*Deeken & Löscher 2007*). Sin embargo, el papel potencial de los inhibidores de Pgp en la superación de la barrera hematoencefálica es todavía una cuestión abierta y la búsqueda de nuevos inhibidores más selectivos continúa (*Thai et al 2015; Belekar et al 2015; Cherigo et al 2015; Ding et al 2014; Shityakov et al 2014*). No deben perderse de vista, sin embargo, las funciones fisiológicas de transporte de sustancias endógenas y detoxificación general del organismo que cumplen los transportadores de eflujo y las consecuencias que podría llevar el bloqueo de estas funciones a largo plazo.

Otras estrategias que podrían proporcionar el suministro de fármacos al cerebro sin la toxicidad asociada al bloqueo de los transportadores de eflujo son la búsqueda de nuevos FAEs que no sean reconocidos por transportadores ABC, mediante diseño asistido por computadora (*Talevi & Bruno Blanch 2013*) y el uso de sistemas de transporte para ocultar a los fármacos de los transportadores de eflujo. Diferentes sistemas de transporte han sido probados para aumentar la

biodisponibilidad de fármacos en el cerebro, entre ellos nanosistemas (nanopartículas poliméricas, nanogeles, nanocápsulas lipídicas, liposomas) (*Bansal et al 2009; Patel et al 2009; Bennewitz & Saltzman 2009; Alam et al 2010*). Los profármacos son otra opción para eludir la barrera sangre-cerebro. Numerosos profármacos de diferentes agentes anticonvulsivos como fenitoína, GABA, ácido valproico y carbamacepina se han desarrollado con el fin de mejorar la biodisponibilidad por la regulación de la absorción del fármaco, distribución y eliminación (*Bennewitz y Saltzman 2009; Trojnar et al 2004; Bialer & Soares-da-Silva 2012*).

El estudio de los patrones de señalización intracelular que controlan la expresión y función de los transportadores ABC ha brindado herramientas en la búsqueda de tratamiento alternativos (*Potschka H 2010b*). Resulta muy interesante la posibilidad de prevenir la sobreexpresión de los transportadores ABC inducida muchas veces por el tratamiento antiepiléptico o por la propia enfermedad mediante la activación de receptores nucleares o a través de señales proinflamatorias. De esta manera, se han propuesto terapias antiinflamatorias, como esteroides e inmunoglobulinas intravenosas, en síndromes epilépticos resistentes a fármacos (*Vezzani & Granata 2005*). Por otro lado, van Vliet y colaboradores han probado el efecto de inhibidores específicos de COX-2 en la expresión de transportadores de eflujo y en los niveles de FAEs en el cerebro de ratas con convulsiones espontáneas recurrentes, mostrando un mantenimiento de

la expresión de Pgp en los niveles de control con el subsecuente incremento en los niveles de fenitoína en el cerebro (*Van Vliet et al 2010*). De manera similar, antagonistas del receptor EP1 lograron suprimir la regulación hacia arriba de transportadores ABC inducida por las convulsiones en el modelo de pilocarpina en rata (*Pekcec et al 2009*). Estos datos proponen que distintas moléculas antiinflamatorias podrían ser una estrategia prometedora para el control de la expresión de Pgp inducida por convulsiones recurrentes (*Rojas et al 2014; Dey et al 2016*).

La resistencia a fármacos es un fenómeno complejo que no puede explicarse con un único mecanismo. La búsqueda de nuevos tratamientos antiepilépticos, así como de tratamientos coadyuvantes requiere de modelos de experimentación que reflejen la problemática abordada. Los modelos intentan reproducir el escenario clínico y, tal como en la clínica, no es posible independizar los distintos mecanismos de resistencia. Nosotros abordaremos la hipótesis de los transportadores en esta tesis, aunque el modelo desarrollado no queda exento de presentar otras formas de resistencia, como podrían ser cambios en los blancos moleculares o alteración de las redes neuronales. En el siguiente capítulo se realiza una revisión de los modelos animales disponibles en la actualidad que han sido utilizados en el estudio de la farmacorresistencia.

Referencias:

Alam MI, Beg S, Samad A, et al. (2010) Strategy for effective brain drug delivery. *Eur J Pharm Sci*, 40:385–403.

Aronica E, Yankaza B, Troost D, et al. (2001) Induction of neonatal sodium channel II and III alpha-isoform mRNAs in neurons and microglia after status epilepticus in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 13:1261–6.

Aronica E, Gorter JA, Jansen GH, et al. (2003) Expression and cellular distribution of multidrug transporter proteins in two major causes of medically intractable epilepsy: focal cortical dysplasia and glioneuronal tumors. *Neuroscience*, 118:417–429.

Aronica E, Gorter JA, Ramkema M, et al. (2004) Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 45:441–451.

Aronica E, Gorter JA, Redeker S, et al. (2005) Localization of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) in Microvessel Endothelium of Human Control and Epileptic Brain. *Epilepsia*, 46(6):849–857.

Aronica E, Crino PB. (2011) Inflammation in epilepsy: clinical observations. *Epilepsia*, 52(3):26–32.

Avemary J, Salvamoser JD, Peraud A, et al. (2013) Dynamic Regulation of P-glycoprotein in Human Brain Capillaries. *Mol. Pharmaceutics*, 10:3333–3341.

Bansal T, Akhtar N, Jaggi M, et al. (2009) Novel formulation approaches for optimizing delivery of anticancer drugs based on P-glycoprotein modulation. *Drug Discov Today*, 14:1067–74.

Bates S, Chen C, Robey R, et al. (2002) Reversal of multidrug resistance: lessons from clinical oncology. *Novartis Found Symp*, 243:83–96.

Banerjee J, Chandra SP, Kurwale N, et al. (2014) Epileptogenic networks and drug-resistant epilepsy: Present and future perspectives of epilepsy research-Utility for the epileptologist and the epilepsy surgeon. *Ann Indian Acad Neurol*, 17(Suppl 1):S134–40.

Bartolomei F, Gastaldi M, Massacrier A, et al. (1997) Changes in the mRNAs encoding subtypes I, II and III sodium channel alpha subunits following kainate-induced seizures in rat brain. *J Neurocytol*, 26:667–78.

Bauer B, Hartz AM, Fricker G, et al. (2004) Pregnane X receptor up-regulation of P-glycoprotein expression and transport function at the blood–brain barrier. *Mol Pharmacol*, 66: 413–419

Bauer B, Hartz AM, Lucking JR, et al. (2008a) Coordinated nuclear receptor regulation of the efflux transporter, Mrp2, and the phase-II metabolizing enzyme, GSTpi, at the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28(6):1222-34.

Bauer B, Hartz AM, Pekcec A, et al. (2008b) Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling. *Mol Pharmacol*, 73(5):1444-1453

Bauer M, Karch R, Zeitlinger M, et al. (2013) Interaction of 11C-tariquidar and 11C-elacridar with P-glycoprotein and breast cancer resistance protein at the human blood-brain barrier. *J Nucl Med*, 54(8):1181-7.

Belekar V, Lingineni K, Garg P. (2015) Classification of Breast Cancer Resistant Protein (BCRP) Inhibitors and Non-Inhibitors Using Machine Learning Approaches. *Comb Chem High Throughput Screen*, 18(5):476-85.

Bennewitz MF, Saltzman, WM. (2009) Nanotechnology for delivery of drugs to the brain for epilepsy. *Neurotherapeutics*, 6:323-36.

Berghuis B, de Kovel CG, van Iterson L, et al. (2015) Complex SCN8A DNA-abnormalities in an individual with therapy resistant absence epilepsy. *Epilepsy Research*, 115:141-4.

Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwinska K, et al. (2008) Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol Rep*, 60:600-622.

Bernard C, Anderson A, Becker A et al. (2004) Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Science*, 305(5683):532-5.

Bialer M, Soares-da-Silva P. (2012) Pharmacokinetics and drug interactions of eslicarbazepine acetate. *Epilepsia*, 53:935-46.

Bialer M, Johannessen SI, Levy RH, et al. (2013) Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Eleventh Eilat Conference (EILAT XI) *Epilepsy Research*, 103:2-30

Bialer M, Johannessen SI, Levy RH, et al. (2015) Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Twelfth Eilat Conference (EILAT XII). *Epilepsy Research*, 111:85-141.

Bien CG, Granata T, Antozzi C, et al. (2000) Pathogenesis, diagnosis and treatment of Rasmussen encephalitis - A European consensus statement. *Brain*, 128:454-471.

Borst P, Evers R, Kool M, et al. (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*, 92:1295-1302.

Brandt C, Bethmann K, Gastens AM, et al. (2006) The multidrug transporter hypothesis of drug resistance in epilepsy: Proof-of-principle in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 24(1):202-211

Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin H et al. (1998) Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat Med*, 10:1166-72.

Chen K, Aradi I, Thon N, et al. (2001) Persistently modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability. *Nature Medicine*, 7:331-337.

Chen Y, Agarwal S, Shaik NM, et al. (2009) P-glycoprotein and breast cancer resistance protein influence brain distribution of dasatinib. *J Pharmacol Exp Ther*, 330(3):956-63.

Cherigo L, Lopez D, Martinez-Luis S. (2015) Marine natural products as breast cancer resistance protein inhibitors. *Mar Drugs*, 13(4):2010-29.

Choi J, Nordli DR, Alden TD, et al. (2009) Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. *J. Neuroinflammation*, 6:38.

Choudhuri S, Cherrington NJ, Li N, et al. (2003) Constitutive expression of various xenobiotic and endobiotic transporter mRNAs in the choroid plexus of rats. *Drug Metab Dispos*, 31:1337-1345.

Cisternino S, Mercier C, Bourasset F, et al. (2004) Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrugresistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res*, 64:3296-3301.

Cooray HC, Blackmore CG, Maskell L, et al. (2002) Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport*, 13:2059 -2063.

Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, et al. (1989) Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci, USA* 86:695- 698.

Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, et al. (1990) Expression of the multidrug resistance gene product (Pglycoprotein) in human normal and tumor tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 138:1277-1287.

Dauchy, S. Dutheil F, Weaver RJ, et al. (2008) ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *J. Neurochem*, 107: 1518-1528.

Decleves X, Regina A, Laplanche JL, et al. (2000) Functional expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp1) in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res*, 60:594-602.

Deeken JF, Löscher W (2007) The Blood-Brain Barrier and Cancer: Transporters, Treatment, and Trojan Horses. *Clin Cancer Res* 13(6):1663-1674.

Demeule M, Regina A, Jodoin J, et al. (2002) Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol*, 38:339-348

Dey A, Kang X, Qiu J, et al. (2016) Anti-Inflammatory Small Molecules To Treat Seizures and Epilepsy: From Bench to Bedside. *Trends in Pharmacological Sciences*. *Trends Pharmacol Sci*, 37(6):463-84.

Ding YL, Shih YH, Tsai FY, et al. (2014) In silico prediction of inhibition of promiscuous breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *PLoS One*, 9(3):e90689.

Dombrowski SM, Desai SY, Marroni M, et al. (2001) Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia*, 42:1501-1506.

Duncan R, Todd N. (1991) Epilepsy and the blood-brain barrier. *Br J Hosp Med*, 45:32-34.

Eisenblatter T, Huwel S, Galla HJ. (2003) Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier. *Brain Res*, 971:221-231.

Ellerkmann RK, Remy S, Chen J, et al. (2003) Molecular and functional changes in voltage-dependent Na(+) channels following pilocarpine-induced status epilepticus in rat dentrate granule cells. *Neuroscience*, 119:323-33.

Fang M, Xi Z, Wu Y, et al. (2011) A new hypothesis of drug refractory epilepsy: Neural network hypothesis. *Medical Hypotheses*, 76:871-876

Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, et al (2010) ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pump. *Nat Rev Cancer*, 10:147-1.

Fromm MF. (2000) P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 38:69 - 74.

Gastaldi M, Robaglia-Schlupp A, Massacrier A, et al. (1998) mRNA coding for voltage-gated sodium channel beta2 subunit in rat central nervous system: cellular distribution and changes following kainate induced seizures. *Neurosci Lett*, 249:53-6.

Higgins CF. (1992) ABC Transporters: From Microorganisms to Man. *Annual Review of Cell Biology*, 8:67-113

Huguenard JR. (2002) Block of T-type calcium channels is an important action of succinimide antiabsence drugs. *Epilepsy Curr*, 2:49-52.

Iannetti P, Spalice A, Parisi P. (2005) Calcium-channel blocker verapamil administration in prolonged and refractory status epilepticus. *Epilepsia*, 46: 967-969.

Iannetti P, Parisi P, Spalice A, et al. (2009) Addition of verapamil in the treatment of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Epilepsy Research*, 85: 89-95.

Iyer A, Zurolo E, Spliet WGM, et al. (2010) Evaluation of the innate and adaptive immunity in type I and type II focal cortical dysplasias. *Epilepsia*, 51:1763-1773.

Iffland PH, Carvalho-Tavares J, Trigunaite A, et al. (2013) Intracellular and circulating neuronal antinuclear antibodies in human epilepsy. *Neurobiol Dis*, 59:206-219.

Janigro D. (2012) Are you in or out? Leukocyte, ion, and neurotransmitter permeability across the epileptic blood-brain barrier. *Epilepsia*, 53(1):26-34.

Keangraphun T, Towanabut S, Chinvarun Y, et al. (2015) Association of ABCB1 C3435T polymorphism with phenobarbital resistance in Thai patients with epilepsy. *J Clin Pharm Ther*, 40(3):315-9.

Kodaira H, Kusuhara H, Ushiki J, et al. (2010) Kinetic analysis of the cooperation of P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting the brain and testis penetration of erlotinib, flavopiridol, and mitoxantrone. *J Pharmacol Exp Ther*, 333:788-796.

Krall RL, Penry JK, Kupferberg HJ, et al. (1978) Antiepileptic drug development: I. History and a program for progress. *Epilepsia*, 19:393-408.

Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, et al. (2010) Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 51(6):1069-1077.

Lang B, Dale RC, Vincent A. (2003) New autoantibody mediated disorders of the central nervous system. *Curr Opin Neurol*, 16:351-357.

Lazarowski A, Czornyj L, Lubienieki F, et al. (2007) ABC Transporters during Epilepsy and Mechanisms Underlying Multidrug Resistance in Refractory Epilepsy. *Epilepsia*, 48(5):140-149.

Lazarowski A, Czornyj L. (2013) Molecular Mechanisms of Pharmacoresistant Epilepsy. In: *Pharmacoresistance in Epilepsy: From Genes and Molecules to Promising Therapies*. Rocha L, Cavalheiro EA (eds.). Springer, New York Heidelberg Dordrecht.

Lee G, Dallas S, Hong M, et al. (2001). Drug transporters in the central nervous system: Brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacol Rev*, 53:569-596.

Li H, Wang B, Chang C, et al. (2015) The roles of variants in human multidrug resistance (MDR1) gene and their haplotypes on antiepileptic drugs response: a meta-analysis of 57 studies. *PLoS One*, 10(3):e0122043.

Li SX, Liu YY, Wang QB (2015) ABCB1 gene C3435T polymorphism and drug resistance in epilepsy: evidence based on 8,604 subjects. *Med Sci Monit*, 21:861-868.

Lin F, Marchetti S, Pluim D, et al. (2013). Abcc4 together with abcb1 and abcg2 form a robust cooperative drug efflux system that restricts the brain entry of camptothecin analogues. *Clin Cancer Res*, 19(8):2084-2095.

Liu Z, Yin X, Liu L, et al. (2015) Association of KEAP1 and NFE2L2 polymorphisms with temporal lobe epilepsy and drug resistant epilepsy. *Gene*, 571(2):231-236.

Löscher W. (1999) The discovery of valproate. In Löscher W (ed.) Valproate. Birkhäuser Verlag Basel. Swizwerland. pp 1-2.

Löscher W, Potschka H. (2002) Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, 301:7-14.

Löscher W, Potschka H. (2005a) Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Progress in Neurobiology*, 76:22-76.

Löscher W, Potschka H. (2005b) Blood-Brain Barrier Active Efflux Transporters: ATP-Binding Cassette Gene Family. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2:86-98.

Löscher W, Klotz U, Zimprich F, et al. (2009) The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. *Epilepsia*, 50(1):1-23.

Löscher W, Schmidt D. (2011) Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: Ways out of the current dilemma. *Epilepsia*, 52(4):657-678.

Lucas PT, Meadows LS, Nicholls J, et al. (2005) An epilepsy mutation in the beta1 subunit of the voltage-gated sodium channel results in reduced channel sensitivity to Phenytoin. *Epilepsy Research*, 64:77-84.

Ludvigsson JF, Zingone F, Tomson T, et al. (2012) Increased risk of epilepsy in biopsy-verified celiac disease: a populationbased cohort study. *Neurology*, 78:1401-1407.

Luna-Tortós C, Fedrowitz M, Löscher W. (2008) Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein *Neuropharmacology*, 55(8):1364-1375.

Lv N, Qu J, Long H, et al. (2015) Association study between polymorphisms in the CACNA1A, CACNA1C, and CACNA1H genes and drug-resistant epilepsy in the Chinese Han population. *Seizure*, 30:64-9.

Ma CL, Wu XY, Zheng J, et al. (2014) Association of SCN1A, SCN2A and ABCC2 gene polymorphisms with the response to antiepileptic drugs in Chinese Han patients with epilepsy. *Pharmacogenomics*, 15(10):1323-36.

Manna I, Gambardella A, Labate A, et al. (2015) Polymorphism of the multidrug resistance 1 gene MDR1/ABCB1 C3435T and response to antiepileptic drug treatment in temporal lobe epilepsy. *Seizure*, 24:124-6.

Marchi N, Tiziana Granata T, Janigro D. (2014) Inflammatory pathways of seizure disorders. *Trends Neurosci*, 37: 55-65.

Martínez-Juárez IE, Hernández-Vanegas LE, Rodríguez N, et al. (2013) Genes Involved in Pharmacoresistant Epilepsy. L. In: *Pharmacoresistance in Epilepsy: From Genes and Molecules to Promising Therapies*. Rocha L, Cavaleiro EA (eds.). Springer, New York Heidelberg Dordrecht.

Miller DS. (2010) Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31:246-254.

Patel MM, Goval BR, Bhadada SV, et al. (2009) Getting into the brain: approaches to enhance brain drug delivery. *CNS Drugs*, 23:35-58.

Pardridge WM. (1999) Blood-brain barrier biology and methodology. *J Neurovirol*, 5:556-569.

Pekcec A, Unkrüer B, Schlichtiger J, et al. (2009) Targeting prostaglandin E2 EP1 receptors prevents seizure-associated P-glycoprotein up-regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 330:939-947.

Potschka H. (2010a) Transporter hypothesis of drug-resistant epilepsy: challenges for pharmacogenetic approaches. *Future Medicine. Pharmacogenomics*, 11(10):1427-1438.

Potschka H. (2010b) Targeting regulation of ABC efflux transporters in brain diseases: a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther*, 125(1):118-27.

Rao VV, Dahlheimer JL, Bardgett ME, et al. (1999) Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug permeability barrier. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:3900-3905.

Remy S, Beck H. (2006) Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain*, 129:18–35

Riazi K, Galic MA, Pittman QJ. (2010) Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: cytokines and brain excitability. *Epilepsy Research*, 89:34–42.

Roberts DJ, Goralski KB. (2008) A critical overview of the influence of inflammation and infection on P-glycoprotein expression and activity in the brain. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 4(10):1245–64.

Robey RW, Lazarowski A, Bates SE. (2008) P-Glycoprotein—a Clinical Target in Drug-Refractory Epilepsy?. *Mol Pharmacol*, 73:1343–1346.

Rogawski MA. (2013) The intrinsic severity hypothesis of pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 54(2):33–40

Rojas A, Jiang J, Ganesh T, et al. (2014) Cyclooxygenase-2 in epilepsy. *Epilepsia*, 55(1): 17–25.

Sawchuk RJ, Elmquist WF. (2000). Microdialysis in the study of drug transporters in the CNS. *Adv Drug Deliv Rev*, 45:295–307.

Schinkel AH. (1999) P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*, 36:179–194.

Schinkel AH, Jonker JW. (2003) Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev*, 55:3–29.

Schmidt D, Beyenburg S. (2009) Antiepileptic drugs. In Aronson JK (Ed.) *Side effects of drugs*. Annual 31. Elsevier, Amsterdam, pp. 105–148.

Schlichtiger J, Pekcec A, Bartmann H, et al. (2010) Celecoxib treatment restores pharmacosensitivity in a rat model of pharmacoresistant epilepsy. *British Journal of Pharmacology*, 160:1062–1071.

Seegers U, Potschka H, Löscher W. (2002) Transient increase of Pglycoprotein expression in endothelium and parenchyma of limbic brain regions in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, 51:257–268.

Seelig A, Blatter XL, Wohnsland F. (2000) Substrate recognition by P-glycoprotein and the multidrug resistance-associated protein MRP1: a comparison. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 38:111–121.

Shityakov S, Forster C. (2014) In silico structure-based screening of versatile Pglycoprotein inhibitors using polynomial empirical scoring functions. *Adv Appl Bioinform Chem*, 7:1–9.

Shorvon SD. (2009a) Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: the first 50 years, 1909–1958. *Epilepsia*, 50(suppl 3):69–92.

Shorvon SD. (2009b) Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: the second 50 years, 1959–2009. *Epilepsia*, 50(suppl 3): 93–130.

Sisodiya SM, Heffernan J, Squier MV. (1999) Over-expression of P-glycoprotein in malformations of cortical development. *Neuroreport*, 10:3437–3441.

Sisodiya SM, Lin WR, Squier MV, et al. (2001) Multidrug-resistance protein 1 in focal cortical dysplasia. *Lancet*, 357:42–43.

Sisodiya SM, Lin WR, Harding BN, et al. (2002) Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain*, 125:22–31.

Sisodiya SM, Martinian L, Scheffer GL, et al. (2003) Major vault protein, a marker of drug resistance, is upregulated in refractory epilepsy. *Epilepsia*, 44:1388–1396.

Skjei KL, Church EW, Harding BN, et al. (2015) Clinical and histopathological outcomes in patients with SCN1A mutations undergoing surgery for epilepsy. *J Neurosurg Pediatr*, 16(6):668–74.

Su H, Sochivko D, Becker A, et al. (2002) Upregulation of a T-Type Ca^{2+} Channel Causes a Long-Lasting Modification of Neuronal Firing Mode after Status Epilepticus. *The Journal of Neuroscience*, 22(9): 3645–3655.

Summers MA, Moore JL, McAuley JW. (2004) Use of verapamil as a potential P-glycoprotein inhibitor in a patient with refractory epilepsy. *Annals of Pharmacotherapy*, 38:1631–1634.

Sun H, Dai H, Shaik N, et al. (2003) Drug efflux transporters in the CNS. *Adv Drug Deliv Rev*, 55:83–105.

Talevi A, Bruno Blanch L. (2013) On the Development of New Antiepileptic Drugs for the Treatment of Pharmacoresistant Epilepsy: Different Approaches to Different Hypothesis. In Rocha L, Cavalheiro EA (eds.) *Pharmacoresistance in Epilepsy: From Genes and Molecules to Promising Therapies*. Springer, New York Heidelberg Dordrecht .

Thai KM, Huynh NT, Ngo TD, et al. (2015) Three- and fourclass classification models for P-glycoprotein inhibitors using counter-propagation neural networks. *SAR QSAR Environ Res*, 26(2):139–63.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, et al. (1989) Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem*, 37:159–164.

Tishler DM, Weinberg KT, Hinton DR, et al. (1995) MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia*, 36:1-6.

Tiwari AK, Zhang R, Gallo JM. (2013) Overlapping functions of ABC transporters in topotecan disposition as determined in gene knockout mouse models. *Mol Cancer Ther*, 12(7):1343-55.

Trojnar MK, Wierzchowska-Cioch E, Krzyżanowski M, et al. (2004) New generation of valproic acid. *Pol J Pharmacol*, 56:283-8.

Urquhart BL, Tirona RG, Kim RB. (2007) Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs. *J. Clin. Pharmacol*, 47:566-578.

van Vliet EA, Redeker S, Aronica E, et al. (2005) Expression of Multidrug Transporters MRP1, MRP2, and BCRP Shortly after Status Epilepticus, during the Latent Period, and in Chronic Epileptic Rats *Epilepsia*, 46(10):1569-1580.

van Vliet EA, van Schaik R, Edelbroek PM, et al. (2006) Inhibition of the multidrug transporter P-glycoprotein improves seizure control in phenytoin-treated chronic epileptic rats. *Epilepsia*, 47(4):672-80.

van Vliet EA, Zibell G, Pekcec A, et al. (2010) COX-2 inhibition controls P-glycoprotein expression and promotes brain delivery of phenytoin in chronic epileptic rats. *Neuropharmacology*, 58:404-412.

van Vliet EA, Forte G, Holtman L, et al. (2012) Inhibition of mammalian target of rapamycin reduces epileptogenesis and blood-brain barrier leakage but not microglia activation. *Epilepsia*, 53:1254-1263.

Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. (2009) Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics*, 3(3):281-90.

Vezzani A, Granata T. (2005) Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia*, 46:1724-1743.

Vezzani A, Baram TZ. (2007) New roles for interleukin-1 beta in the mechanisms of epilepsy. *Epilepsy Curr*, 7:45-50.

Verrotti A, Palka C, Prezioso G, et al. (2015) Deletion 18p11.32p11.31 in a Child with Global Developmental Delay and Atypical, Drug-Resistant Absence Seizures. *Cytogenet Genome Res*, 146(2):115-9.

Vlaming ML, Pala Z, van Esch A, et al. (2009) Functionally overlapping roles of Abcg2 (Bcrp1) and Abcc2 (Mrp2) in the elimination of methotrexate and its main toxic metabolite 7-hydroxymethotrexate in vivo. *Clin Cancer Res*, 15(9):3084-93.

Volk HA, Burkhardt K, Potschka H, et al. (2004) Neuronal expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures. *Neuroscience*, 123:751-759.

Volk HA, Potschka H, Löscher W. (2004) Increased expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in limbic brain regions after amygdala-kindled seizures in rats. *Epilepsy Res*, 58:67-79.

Volk H, Potschka H, Löscher W. (2005) Immunohistochemical localization of p-glycoprotein in rat brain and detection of its increased expression by seizures are sensitive to fixation and staining variables. *J Histochem Cytochem*, 53(4):517-31.

Whitaker WR, Faull RL, Dragunow M, et al. (2001) Changes in the mRNAs encoding voltage-gated sodium channel types II and III in human epileptic hippocampus. *Neuroscience*, 106:275-85.

Yu L, Liao WP, Yi YH, et al. (2015) ABCB1 G2677T/A polymorphism is associated with the risk of drug-resistant epilepsy in Asians. *Epilepsy Res*, 115:100-8.

Zhang L, Ong WY, Lee T. (1999) Induction of P-glycoprotein expression in astrocytes following intracerebroventricular kainate injections. *Exp Brain Res*, 126:509-516.

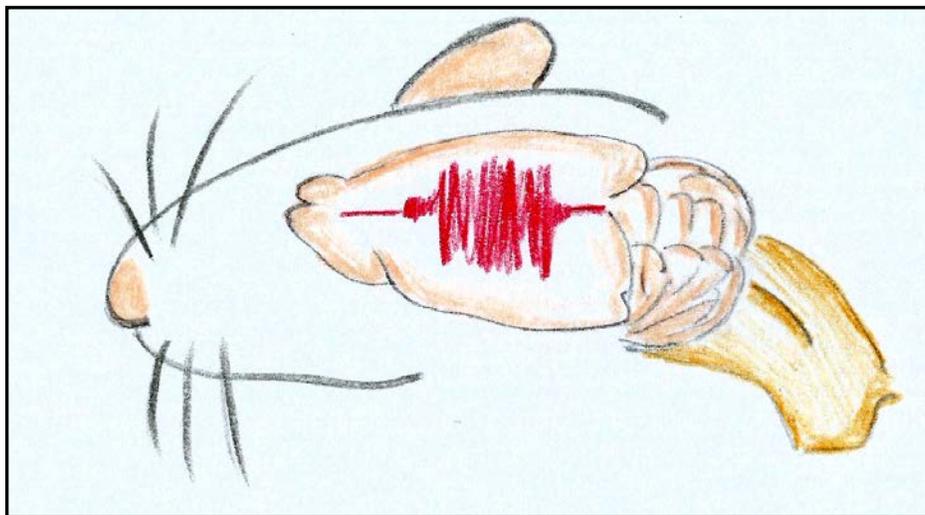
Zhou L, Cao Y, Long H, et al. (2015) ABCB1, ABCC2, SCN1A, SCN2A, GABRA1 gene polymorphisms and drug resistant epilepsy in the Chinese Han population. *Pharmazie*, 70(6):416-20.

Zhu HJ, Liu GQ. (2004) Glutamate up-regulates P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells by an NMDA receptor-mediated mechanism. *Life Sciences*, 75: 1313-1322.

Zibell G, Unkrüer B, Pekcec A, et al. (2009) Prevention of seizure-induced up-regulation of endothelial P-glycoprotein by COX-2 inhibition. *Neuropharmacology*, 56:849-855.

CAPÍTULO III

Modelos para la Evaluación de Anticonvulsivos



Capítulo III

Modelos para la Evaluación de Anticonvulsivos

Las drogas antiepilépticas desarrolladas en los últimos 30 años han sido identificadas mediante la evaluación sistemática en un número creciente de modelos *in vitro* e *in vivo*. Un programa de evaluación de fármacos anticonvulsivantes ha sido propuesto por el National Institutes of Health (NIH), como parte del programa de desarrollo de fármacos antiepilépticos (ADD) con el objetivo de brindar un servicio de evaluación tanto a la industria farmacéutica como al sector académico (*Krall et al 1978*), que ha sido utilizado mundialmente hasta la actualidad (*Löscher 2011; Kamal et al 2013; Karakaya et al 2013; Ugale and Bari 2016; Song et al 2016*). El programa ADD consta de varias fases que se esquematizan en la figura 1. Las etapas tempranas de evaluación de los nuevos candidatos permiten la selección de los compuestos que resultan promisorios y, por lo tanto, el descarte de aquellos que muestran poca o nula actividad, en poco tiempo, con bajo costo y sin dificultades técnicas (*White et al 2006*).

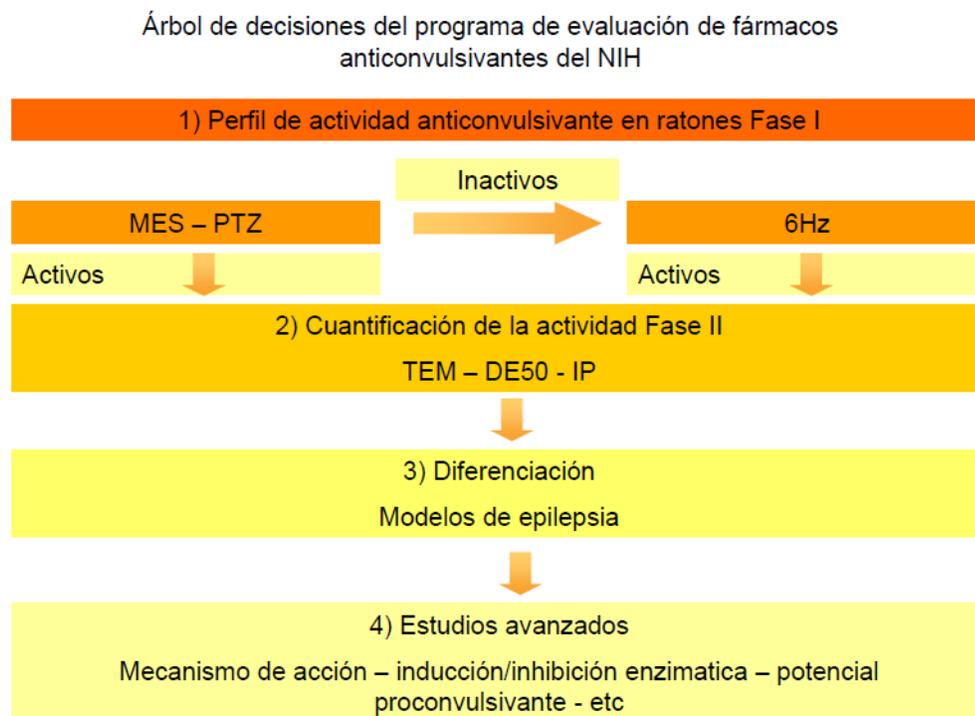


Figura 1: Esquema del programa de evaluación de fármacos antiepilépticos.

**TEM: tiempo de efecto máximo. DE50: dosis efectiva 50. DT50: dosis tóxica 50.
IP: Índice de protección (DE50/DT50)**

La fase I del programa consiste en la determinación cualitativa de la actividad anticonvulsivante. Los candidatos se evalúan en 3 modelos de convulsiones agudas [Maximal Electroshock Seizure (MES), Pentilenetetrazol (PTZ) y 6 Hz] en ratones. Los fármacos deben ser administrados por vía i.p. (intraperitoneal) a diferentes dosis (30, 100, 300 y 600 mg/kg) y la evaluación se realiza a diferentes tiempos (30 min y 4 h) de manera de obtener un perfil de actividad. A cada una de esas dosis y tiempos también se evalúa el efecto neurotóxico de los fármacos, manifestado mediante signos de ataxia y sedación,

mediante el test rotorod (*Jones et al 1968*) o el test de la chimenea (*Boissier et al 1960*).

De acuerdo a los resultados de la fase I los compuestos se clasifican en las siguientes categorías:

CATEGORIA I: compuestos activos a dosis ≤ 100 mg/kg. Estos compuestos seguirán siendo evaluados en la fase II del programa.

CATEGORIA II: compuestos activos a dosis = 300 mg/kg. Su posterior evaluación dependerá de su estructura química, particularmente de su PM y de la presencia de características que justifiquen la utilización de una dosis alta.

CATEGORIA III: compuestos activos a dosis 600 mg/kg o inactivos. Estos compuestos serán eliminados del programa.

CATEGORIA IV: compuestos activos a dosis ≤ 100 mg/kg pero que muestran signos de neurotoxicidad a la misma dosis. En este caso se reevalúan a dosis < 30 mg/kg.

La Fase II del programa consiste en la cuantificación de la actividad anticonvulsivante de aquellos fármacos que superaron la fase I. En esta fase se realiza la determinación del Tiempo de Efecto Máximo (TEM), la dosis necesaria para proteger al 50% de los animales testeados (DE50) determinadas en los mismos modelos de convulsión propuestos en la fase I, el Tiempo de Toxicidad Máxima

(TTM) y la dosis que en el test rotorod resulta tóxica para el 50% de los animales tratados (DT50). Los datos de DE50 y DT50 son de utilidad para la determinación del Índice de Protección ($IP = DE50/DT50$). Esta fase de evaluación también se realiza en ratones y los fármacos se administran por vía i.p.

Las siguientes fases del programa comprenden la determinación del perfil de toxicidad por vía oral, la identificación del mecanismo de acción, el efecto de la administración prolongada de los fármacos, entre otros estudios avanzados (*Stables et al 1997*).

Los modelos de convulsiones agudas se ejecutan en animales sanos, con cerebros no epilépticos, por lo que no representan el proceso de epileptogénesis, así como no reflejan las alteraciones celulares y moleculares que contribuyen al fracaso terapéutico en la epilepsia resistente a fármacos (*Bialer et al 2010*). Por este motivo se ha propuesto la utilización de **modelos de epilepsia**, y de **modelos de epilepsia fármacorresistente** en las fases avanzadas del programa para identificar nuevas terapias con mayor eficacia (*Löscher 2011*). Los modelos de epilepsia fármacorresistente intentan representar el problema clínico de los pacientes que son refractarios a los fármacos disponibles en la actualidad. Estos modelos se basan en la suposición de que un cerebro sano agraviado a través de sucesivas convulsiones o crisis prolongadas puede transformarse en un cerebro epiléptico, e incluso adquirir el fenotipo resistente a múltiples FAEs. La mayoría de los fármacos que se han desarrollado o están en fase de desarrollo desde 2004 hasta el

presente, algunos de ellos en fase preclínica o clínica, han sido evaluados con resultados positivos en modelos de epilepsia. Muchos de ellos tienen nuevos mecanismos de acción, diferentes a los que participan en la acción de los antiepilépticos clásicos descubiertos por modelos agudos (*Bialer et al 2015*).

Modelos de convulsiones agudas

1- Maximal Electroshock Seizure (MES)

El modelo MES fue desarrollado en 1946 por Toman Swinyard y Goodman, y, desde entonces, ha sido utilizado para identificar anticonvulsivantes con acción sobre convulsiones generalizadas tónico clónicas. Este modelo también ha sido propuesto para la identificación de agentes capaces de bloquear crisis parciales en pacientes, sin embargo, algunos anticonvulsivantes efectivos contra este tipo de crisis, como levetiracetam y vigabatrina, no han mostrado actividad en este test.

En el ensayo MES tradicional, los roedores reciben un estímulo eléctrico correspondiente a 5-10 veces el estímulo necesario para alcanzar el umbral convulsivo, de manera de evitar variaciones en la inducción de convulsiones tónico-clónicas debido a las fluctuaciones intra e interindividuales en el umbral convulsivo. Por lo tanto, el 100% de los animales sin tratamiento anticonvulsivante exhibirán extensión tónica de las extremidades traseras tras la estimulación. El estímulo al que referimos es logrado mediante un generador de pulsos seteado con los siguientes parámetros:

Corriente: 50mA (ratones) / 150 mA (ratas)

Frecuencia de pulso: 60 Hz

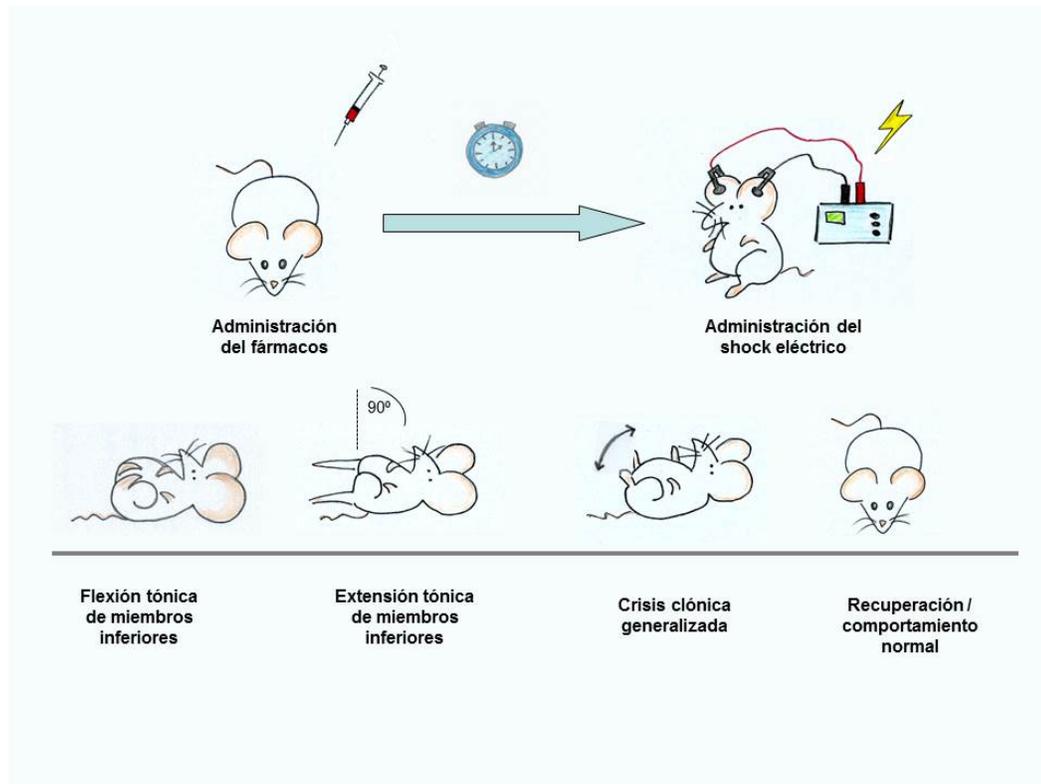
Ancho de pulso: 0,6 ms

Duración del estímulo: 0,2 s

La estimulación MES se puede aplicar a través de electrodos corneales o auriculares.

Inmediatamente después de la aplicación del estímulo comienzan las convulsiones que constan de 3 fases: una fase de flexión tónica de los miembros posteriores, que dura unos pocos segundos; una fase de extensión tónica generalizada que puede durar de 10 a 15 s y, finalmente, una fase de recuperación en la que los animales manifiestan una crisis clónica generalizada. Luego de 20-30 s los animales recuperan la postura retornando a un comportamiento normal.

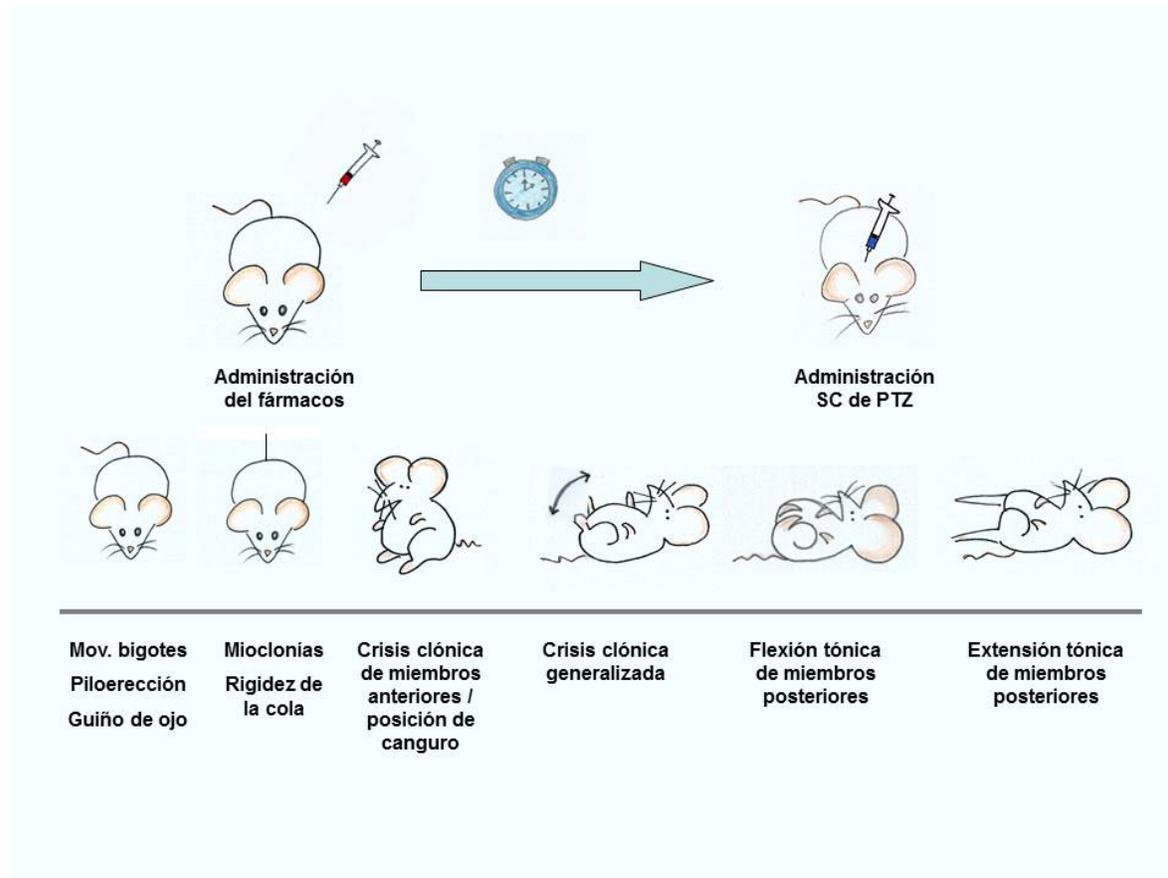
La prueba se considera positiva si, dentro de los 10 s siguientes a la estimulación, el animal presenta una extensión de los miembros posteriores que muestra un ángulo de más de 90 ° y se mantiene durante más de 3 s (*Castel-Branco et al 2009*).



2- Pentilenetrazol (PTZ)

En el año 1944, el modelo de PTZ fue publicado por Everett y Richards (*Everett and Richard 1944*). PTZ es un agente químico que actúa antagonizando el receptor $GABA_A$ de manera no competitiva (*Jung ME et al 2002, Ma et al 2007*). En la prueba, el PTZ se administra por vía subcutánea (s.c.) sobre animales sanos, en la dosis efectiva 97, es decir, la dosis que induce convulsiones en el 97% de los animales (DE97). A un tiempo menor de 30 min después de la inyección, los animales presentan una crisis en la que 6 fases pueden ser observadas: Fase 1: piloerección, movimiento de bigotes, guiño de ojo, movimiento de cabeza (nooding); Fase 2: sacudidas mioclónicas; Fase 3: clonus de extremidades

anteriores; Fase 4: posición de canguro; Fase 5: crisis clónica generalizada con pérdida de la postura; Fase 6: crisis tónica generalizada (*Mandhane et al 2007*).



Inmediatamente después de la administración de PTZ, los animales se observan durante 30 min para registrar la latencia y duración de cada fase.

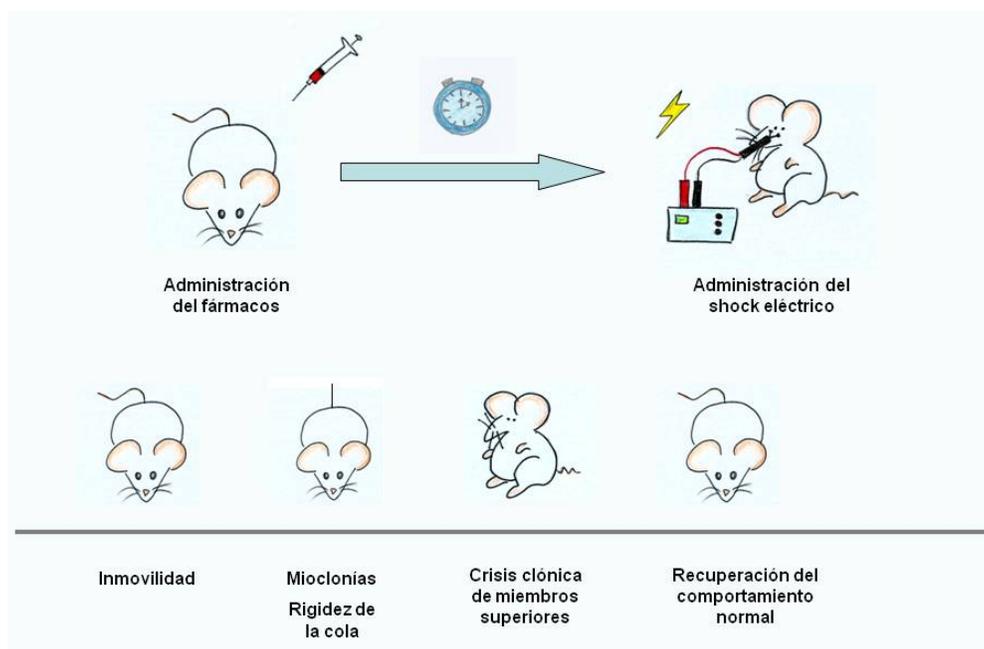
El valor de la DE97 suele ser de 85 mg/kg para ratones y 90 mg/kg para ratas. Sin embargo, hay informes que sugieren que la respuesta a PTZ puede cambiar de acuerdo a diferentes variables, tales como la estación del año, el clima, la humedad, y el lote de animales. Por este motivo, es aconsejable que cada

laboratorio determine la dosis experimental 97% (que puede variar entre 70 y 100 mg/kg para ratones) (*Löscher et al 1991, Löscher & Fiedler 1996*).

El criterio de protección en este modelo suele ser la ausencia de crisis clónica, parcial o generalizada (fase 3 en adelante); sin embargo, la posibilidad de evaluar la latencia y duración de cada una de las fases y compararlas con un grupo control (sin tratamiento con agentes antiepilépticos) permite obtener más información de los compuestos evaluados, consiguiendo una mayor sensibilidad.

3- Modelo de crisis parciales (6 Hz)

Este modelo se basa en la estimulación eléctrica de baja frecuencia (6Hz) durante 3 s mediante electrodos corneales. La crisis inducida mediante este método es caracterizada por inmovilidad, clonus de miembros anteriores y comportamiento automatizado (manifestaciones similares a la epilepsia límbica en los seres humanos). Este estado tiene una duración mayor a 10 s (*Barton et al 2001*). Los animales que no presenten ninguna de estas manifestaciones, o que lo hagan por un tiempo menor a 10 s serán considerados protegidos.



Luego de la primera descripción por Tomas en 1951, este modelo estuvo fuera de uso durante varias décadas debido a que varios FAEs estándar no protegían las crisis inducidas. Posteriormente, al profundizar la caracterización del modelo se observó que las diferentes respuestas de los fármacos dependen de la intensidad de la corriente aplicada. Es posible por tanto que, FAEs que no muestran actividad protectora a 44 mA puedan ser activos cuando la corriente aplicada es de 32 ó 22 mA (*Barton et al 2001*).

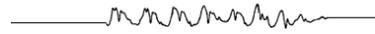
Este modelo se caracteriza por una pobre respuesta a los clásicos bloqueantes de canales de sodio dependientes de voltaje, los cuales son activos en el ensayo MES. Este hecho condujo a la discusión acerca de si el modelo de convulsión psicomotora 6 Hz es o no es un modelo de farmacorresistencia (*Löscher et al 2013*). Sin embargo, puesto que se utilizan animales sanos, no puede

explicarse un mecanismo responsable de la generación de resistencia a la acción de los fármacos.

Modelos de Epilepsia

La capacidad de reproducir patologías humanas en modelos animales presenta una gran ventaja para la medicina experimental moderna. El modelo animal ideal es un modelo que reproduce a la perfección el trastorno humano en todos los aspectos. Por otra parte, el modelo animal podría ser isomorfo, cuando se reproduce el trastorno, pero no la etiología subyacente (nótese que en muchas enfermedades neurológicas la etiología no se conoce totalmente), o predictivo, cuando no se asemeja al trastorno humano, pero permite predicciones acerca de él o de su respuesta al tratamiento (*Mogensen 2003*).

Algunos modelos de epilepsia se han utilizado en los últimos años para obtener una mejor comprensión de los trastornos epilépticos, sobre todo en epilepsia del lóbulo temporal (TLE), el tipo más común de epilepsia parcial compleja en adultos (*Nagao et al 2013*), la cual presenta una pobre respuesta a FAEs. Algunos de estos modelos permiten la selección de animales respondedores y no respondedores al tratamiento con diferentes FAEs, por lo que han sido utilizados para identificar los mecanismos de resistencia que sirven como objetivo en la búsqueda de terapias mejoradas (*Brandt et al 2004, Brandt & Löscher 2014, Bankstahl JP & Löscher 2008, Löscher & Brandt 2010*).



1- Modelos de convulsiones recurrentes espontáneas subsecuentes al estado epiléptico.

El estado epiléptico o Status Epilepticus (SE) es descrito por la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) como *“una condición caracterizada por una crisis epiléptica que es suficientemente prolongada, o repetida a intervalos suficientemente breves, para producir una condición epiléptica invariable y duradera” (Trinka et al 2015).*

La fisiopatología del SE no se entiende claramente, pero se piensa que la neurotransmisión excitatoria excesiva (glutamato) y la pérdida de la neurotransmisión inhibitoria normal (GABA) son los mecanismos más probables *(ILAE 1997).*

El término "epileptogénesis" se utiliza para describir los cambios plásticos complejos en el cerebro que, después de un insulto precipitante o lesión, y que, sumados a la neuroinflamación asociada, transforman un cerebro normal en un cerebro con una mayor predisposición a las convulsiones *(Pitkänen & Engel 2014).* El proceso de epileptogénesis implica tres etapas: un evento inicial precipitante; un período de latencia y; un período crónico de convulsiones espontáneas.

Los modelos de crisis espontáneas recurrentes seguidas de SE que son utilizados en la evaluación de fármacos, consisten en inducir un SE como insulto precipitante, con el fin de causar un daño cerebral inicial y, de este modo, predisponer a los animales a ser epilépticos, lo que significa que, después de un

período de latencia, ocurre la aparición de convulsiones espontáneas recurrentes (CERs) acompañadas de eventos electroencefalográficos convulsivos, esclerosis del hipocampo y reorganización sináptica que afecta principalmente a las fibras musgosas de la capa molecular interior del giro dentado. Todas estas manifestaciones son características de la epilepsia del lóbulo temporal (ELT) (*Reddy & Kuruba 2013*).

El SE puede ser inducido en roedores mediante la administración de agentes químicos convulsivantes o por estimulación eléctrica. Los estímulos más utilizados son ácido kaínico (AK), pilocarpina (PILO) y estimulación eléctrica de la amígdala basolateral (BLA). La inducción del SE mediante agentes químicos tiene la ventaja de no requerir equipamiento especial ni entrenamiento del personal, a diferencia de la inducción eléctrica u otros modelos, tales como trauma cerebral o convulsiones febriles.

Los modelos de convulsiones recurrentes tienen la particularidad de permitir la evaluación de la capacidad de los fármacos para prevenir o reducir la gravedad y frecuencia de las convulsiones espontáneas en animales epilépticos, pero también permiten la evaluación de otros efectos de los fármacos como su capacidad para prevenir el desarrollo de SE, o para evitar la epileptogénesis después del mismo.

1.1- Modelo de Ácido Kaínico

El ácido kaínico (AK) es un agonista de los receptores ionotrópicos de glutamato correspondientes a la subclase kainato. Es un análogo estable de glutamato, 30 veces más neurotóxico (*Zhang & Zhu 2011*).

La administración de AK a los roedores causa un síndrome convulsivo bien caracterizado. El AK puede ser administrado por vía intravenosa, intraperitoneal, intranasal o mediante microinyecciones en amígdala o hipocampo. Las convulsiones registradas electrográficamente pueden ser no convulsivas o crisis motoras convulsivas. Debido a que hay una gran variedad de protocolos que incluyen la inducción de SE por AK, describiremos dos protocolos; uno en ratones y otro en ratas.

- **Administración intrahipocampal en ratones - SE no convulsivo.**

Los ratones se anestesian y se les inyecta kainato (0,21 g en 50 nl de solución salina) estereotáxicamente en el área CA1 del hipocampo dorsal derecho en un tiempo de 60 seg utilizando una microjeringa (*Paxinos & Franklin 2001*). Para los registros de EEG, se implantan electrodos bipolares en el hipocampo dorsal, en el lado ipsilateral de la inyección, utilizando las mismas coordenadas que para la inyección de kainato. Antes de los procedimientos de implantación se deben administrar antibióticos profilácticos sobre la base de asesoramiento veterinario.

Inmediatamente después de la cirugía, los ratones son monitorizados mediante electroencefalograma durante 24 h para registrar el SE no convulsivo inducida por kainato. Luego de 4-10 semanas del SE, se registran alteraciones

paroxísticas espontáneas en el EEG en el 88% de los ratones tratados con kainato, las cuales no son asociadas con convulsiones conductuales. CERs de tipo clónicas generalizadas se observan recién en las semanas o meses posteriores en el 60% de los ratones tratados; las mismas se encuentran asociadas a una rápida descarga paroxística en el EEG. Por otra parte, también se registran anomalías del EEG interictal (picos aislados o en ráfagas cortas) en los ratones tratados con kainato (*Groticke et al 2008*).

- **Administración intraperitoneal en ratas - SE convulsivo**

En este caso, los electrodos intrahipocampales se colocan bilateralmente en la capa de células granulares.

Ensayos *in vivo* e *in vitro* mostraron que el giro dentado está involucrado en las convulsiones de los pacientes con epilepsia del lóbulo temporal y por esta razón se elige como blanco para el registro electrográfico intracraneal.

Los electrodos intrahipocampales se construyen a partir de alambre de acero recubierto de teflón y se implantan utilizando coordenadas estereotáxicas. De una a dos semanas después de la cirugía de implantación, las ratas se inyectan con AK (5 mg/kg/h; i.p.) disuelto en solución salina estéril al 0,9% mediante una perfusión de al menos 3 h de duración. Las ratas deben ser continuamente monitoreadas por electroencefalografía y observación del comportamiento convulsivo. Los animales muestran más de 10 convulsiones parciales o generalizadas por hora. A partir de los 8 días posteriores a la inducción del SE,

puede observarse la primera convulsión electrográfica, mientras que la primera convulsión motora aparece un mes después del SE (*Williams et al 2009*).

Los modelos de AK presentan una alta mortalidad, siendo hasta del 50% en ratones (*Ahmad et al 2013*). Para reducir la tasa de mortalidad se recomienda ayudar a los animales en la alimentación e hidratación durante el período de letargo, que aparece después del SE y que puede durar hasta 3 días.

1.2- Modelo de Pilocarpina.

El modelo de pilocarpina es altamente isomórfico con la ELT en humanos, por este motivo ha sido ampliamente usado desde su descripción en el año 1983 (*Turski et al 1983*).

La ocurrencia de una extensa lesión asociada a reorganización de redes neuronales en las regiones hipocampales y parahipocampales (como fibras musgosas emergentes, proliferación ectópica de células granulares dentadas, y pérdida de interneuronas) son fenómenos que ocurren tanto en animales que sufren SE por pilocarpina como en los pacientes con ELT; algunos de ellos incluso están localizados en las mismas áreas del cerebro. El hecho de que las convulsiones no logran ser bien controlados por los antiepilépticos también es un fenómeno compartido (*Curia et al 2008*).

El SE es inducido en este caso, mediante activación de receptores muscarínicos M1 hipocampales (*Hamilton et al 1997*). Sin embargo, se cree que una vez iniciada la crisis, su mantenimiento en el tiempo depende de la activación

de los receptores NMDA hipocampales, aunque no hay suficiente evidencia disponible que sustente esta teoría (*Smolders et al 1997*).

El modelo de pilocarpina, ha sido adaptado en diferentes laboratorios dependiendo del propósito de los experimentos. De esta manera, se encuentran reportes con diferencias en cuanto a la dosis de pilocarpina, la duración del SE, los pre-tratamientos, la especie y la cepa de animales.

El modelo de pilocarpina original consiste en la administración de 300-400 mg/kg de pilocarpina a ratas adultas. Bajo esas condiciones puede observarse una crisis de evolución progresiva (*Curia et al 2008*). Aproximadamente el 60% de las ratas tratadas con pilocarpina desarrolla SE que finaliza espontáneamente 5-6 hs después de la administración. Luego de las manifestaciones convulsivas, los animales entran en un período de coma post-ictal que puede durar de 1-2 días (*Turski et al 1989*).

La tasa de mortalidad que ha sido reportada es del 30-40% en los mejores casos. Para reducir este número algunos investigadores dividen la administración de pilocarpina en dos etapas, una inyección inicial de 200 mg/kg y luego una dosis adicional de 100 mg/kg. Esta forma de tratamiento reduce la mortalidad, pero también extiende el tiempo de inicio del SE (*Glien et al 2001*).

Otra alternativa para reducir la mortalidad es limitar el tiempo en el que se mantiene el SE, mediante la administración de diazepam; sin embargo, la duración

del SE es crucial para el desarrollo del síndrome epiléptico y, por lo tanto, produce variaciones en el período de latencia.

La duración del periodo de latencia, el número y frecuencia de crisis espontáneas y la severidad son variables y dependientes del tratamiento usado, pero también se ha notado que estos resultados varían dependiendo del método utilizado en el monitoreo de los animales (inspección visual, monitoreo por video o registro continuo mediante video-EEG) (*Curia et al 2008*).

Ha sido demostrado que la administración intrahipocampal de pilocarpina es tan eficiente como la ruta i.p. para inducir SE y, subsecuentemente, epilepsia. De hecho, los animales que reciben pilocarpina directamente en el hipocampo muestran idénticos comportamientos, electrografía y cambios neuropatológicos con la ventaja de que reduce drásticamente la mortalidad (*Furtado et al 2002*).

Los esfuerzos para reducir la tasa de mortalidad de los animales tratados con pilocarpina y para mejorar el rendimiento del modelo han dado lugar a varias combinaciones de pilocarpina con otros fármacos. Entre ellos, la combinación de litio-pilocarpina es la más utilizada.

El litio se administra 24 horas antes de la inducción del SE permitiendo una disminución significativa en la dosis de pilocarpina necesaria para inducir las convulsiones (30 mg/kg). Es importante destacar que esta dosis es 10 veces menor que la usada sin litio. Los síndromes producidos por el tratamiento con litio-

pilocarpina o altas dosis de pilocarpina son metabólica, electrográfica, comportamental y neuropatológicamente idénticos (*Curia et al 2008*).

El modelo de litio-pilocarpina tiene la ventaja de inducir convulsiones tónico-clónicas y SE en el 100% de los animales, mientras que en el tratamiento con pilocarpina a altas dosis sólo el 60% de los animales desarrolla esas crisis.

Existe otro protocolo que propone la administración de una dosis baja del relajante muscular central xilazina, que reduce la gravedad de las contracciones musculares clónicas sin afectar las crisis electroencefalográficas (*Thompson et al 2007, Yang et al 2006*). Con este tratamiento, es posible obtener tasas de mortalidad de cero, tanto en ratas como en ratones, con un éxito del 90-100% en la generación de CERs.

La administración de α -metilescopolamina (1 mg/kg) 30 min antes de la pilocarpina, ha sido también utilizada para minimizar la activación colinérgica periférica. Sin este tratamiento previo, los animales presentan signos clásicos de la estimulación colinérgica periférica después de la inyección de pilocarpina, incluyendo piloerección, salivación, temblores, diarrea y cromodacriorrea (*Clifford et al 1987*). No hay evidencia de que las dosis bajas de α -metilescopolamina alteren efectos centrales de la pilocarpina, pero las dosis más altas (10 mg/kg en ratones y 20 mg/kg en ratas; administrada por vía subcutánea) pueden prevenir la inducción del SE (*Turski et al 1983, 1984*).

Las ratas y, en menor medida los ratones, son las especies animales más utilizadas para reproducir este modelo animal de ELT. Estas dos especies tienen un comportamiento y electroencefalografía de las convulsiones inducidas por pilocarpina similares como también una similar respuesta dosis-dependiente. Sin embargo, los ratones pueden ser más sensibles a la pilocarpina porque la dosis necesaria para provocar convulsiones está muy cerca de la dosis letal. Tras la administración de 325 mg/kg, se observan severas convulsiones tónico-clónicas que provocan la muerte en el 25% de los animales. La mortalidad aumenta a 50% y 100% con 350 y 400 mg/kg de pilocarpina, respectivamente (*Curia et al 2008*).

1.3- Estimulación eléctrica prolongada de la amígdala basolateral (BLA)

Se recomienda usar ratas hembra Sprague-Dawley en este modelo debido a que se obtiene la mayor frecuencia de crisis generalizadas en comparación con otras especies, con alto porcentaje (> 90%) de desarrollo de CERs (*Brandt et al 2003*).

Las ratas son anestesiadas para la implantación de los electrodos. Un electrodo de acero inoxidable aislado con teflón es implantado estereotáxicamente en el núcleo basolateral anterior derecho de la amígdala (BLA) y sirve tanto para la estimulación como para el posterior registro.

Alrededor de 2 semanas después de la implantación de electrodos, las ratas se estimulan eléctricamente para la inducción de un SE autosostenido (*Volk & Löscher 2005*). Todos los animales desarrollan SE con convulsiones generalizadas o

crisis parciales interrumpidos por episodios de crisis generalizadas. El SE es finalizado 4 horas después por la administración de diazepam (10 mg/kg, i.p.). En un período de entre 1 y 3 meses después de la estimulación, los animales muestran la primera crisis espontánea. El tipo y número de crisis espontánea son registradas mediante videocámaras durante un periodo de 4 semanas (*Brandt et al 2004*).

En cuanto a la resistencia a fármacos desarrollada en estos animales, 36% de las ratas no responden a fenobarbital cuando se administra en la etapa de CER (*Mogensen 2003*).

Otros estudios indican desarrollo de resistencia a fenobarbital y a diazepam en este modelo cuando son administrados con el objetivo de finalizar el SE. Esta resistencia se asocia a un incremento en la expresión de glicoproteína P (*Bankstahl JP & Löscher 2008*).

2- Modelos de Kindling

El fenómeno de “kindling” o “encendido” involucra la estimulación de una estructura del sistema límbico (usualmente amígdala o hipocampo), mediante un agente químico o eléctrico. El estímulo efectuado es inicialmente subconvulsivante pero con el tiempo se produce un aumento de la excitabilidad neuronal y, por lo tanto, una reducción en el umbral de convulsión.

Para este propósito se inducen convulsiones focales secundariamente generalizadas con aumento gradual de la gravedad y duración aplicando el mismo estímulo a través de varios días. En un período de tiempo relativamente largo

(puede ser de 3 a 8 semanas dependiendo de la estructura estimulada) se pueden observar cambios en el EEG y la neurofisiología, así como en el comportamiento y la respuesta a los FAEs (*Löscher 2006*).

Estos modelos pueden ser útiles tanto para evaluar la actividad antiepiléptica como antiepileptogénica dependiendo de la etapa del modelo en el que se evalúan las drogas. Si el fármaco se administra al final del proceso (a los animales encendidos), sería posible evaluar la actividad antiepiléptica; si los animales resultan ser resistentes a los FAEs estándar se pueden utilizar para evaluar la capacidad de un compuesto dado para evadir los mecanismos de resistencia a fármacos. Sin embargo, si el fármaco candidato es administrado todos los días durante el proceso de kindling se podrá evaluar su actividad antiepileptogénica.

2.1- Kindling Eléctrico

En los modelos de kindling eléctrico, los animales son implantados crónicamente con un electrodo de estimulación en una estructura del sistema límbico u otras áreas del cerebro, siendo la amígdala una de las estructuras más sensibles (*Löscher 2006*).

Los electrodos consisten en dos alambres de acero inoxidable trenzados recubiertos de teflón de 0.25 mm de diámetro separados por 0.5 mm en la



punta. Para su implantación las ratas son anestesiadas y un electrodo bipolar es implantado dentro del hemisferio derecho, en la amígdala basolateral usando coordenadas estereotáxicas (*Freichel et al 2004*).

El umbral de post descarga (ADT) se determina 1-2 semanas después de la implantación de los electrodos. Al día siguiente, las ratas son encendidas a un valor de estímulo correspondiente al 120% del valor individual de ADT (*Lu et al 2015*). De esta manera, se estimula eléctricamente la amígdala de las ratas durante todo el proceso de encendido. Las severidades de las crisis son clasificadas de acuerdo a la escala de Racine (*Racine 1972*) (Tabla 1). Un número promedio de 15-20 estimulaciones es necesario para lograr 10 crisis de severidad 5 consecutivas, lo cual se denomina estado *kindled*. Se requiere alrededor de 6 estimulaciones para lograr la primera crisis de grado (score) 5 (*Seegers et al 2002*).

Score	Descripción
1	Inmovilidad
	Mov. estereotipados
	Guiño
	Mov. de bigotes
2	Clonus facial
	Nooding
3	Clonus unilateral de miembros anteriores (contralateral al sitio de estimulación)
4	Husmeo
	Clonus bilateral de miembros anteriores
5	Husmeo con pérdida del equilibrio
	Pérdida de la postura
	Convulsiones clónicas generalizadas

Tabla 1: Escala de Racine para la caracterización de las convulsiones presentadas en el modelo de kindling de amígdala.

El aumento de la sensibilidad a la estimulación eléctrica persiste por lo menos durante meses después de la adquisición del estado *kindled* y por lo tanto parece reflejar cambios persistentes en la función cerebral. Además, si la estimulación eléctrica periódica se continúa en ratas encendidas, éstas desarrollan convulsiones espontáneas recurrentes focales y secundariamente generalizadas. Convulsiones espontáneas inducidas por kindling también se han identificado en otras especies, incluyendo babuinos, perros y gatos (*Löscher & Ebert 1996*).

En el año 2014, Morales y colaboradores, reportaron una alternativa al protocolo de kindling clásico o lento (SK). Este nuevo protocolo llamado "kindling rápido" (RK), consiste en la estimulación de la amígdala basolateral (BLA) con 10 trenes de pulsos bifásicos (10 s; 50 Hz) por día con intervalos de 20 min, durante 3 días consecutivos, usando una intensidad subumbral, lo que garantiza la integridad del tejido.

El protocolo RK induce un estado convulsivo similar al protocolo de SK, pero en sólo 3 días, con umbral convulsivo bajo persistente y cambios celulares en áreas de proyección de la amígdala. Este nuevo protocolo RK introduce una nueva variante de los modelos de epileptogénesis y epilepsia en ratas que se mueven libremente, es altamente reproducible y produce un mínimo daño celular con respecto a la observada en otros modelos experimentales de epilepsia (*Morales et al 2014*).

El kindling eléctrico también puede realizarse en ratones. Se utilizan ratones entre 25-30 grs los cuales se anestesian para implantar estereotáxicamente un electrodo bipolar en el hipocampo ventral derecho. Después de un período de recuperación de 7 días, se determina el ADT. La estimulación para el kindling consiste en la aplicación de un estímulo del 125% del ADT una vez al día, utilizando un estimulador de pulso aislado hasta que son provocadas crisis de score 5 por tres días consecutivos. Las convulsiones conductuales son similares a las descritas en ratas y se clasifican de acuerdo a la escala de Racine (*Reddy & Ramanathan 2012*).

2.2- Kindling corneal 6 Hz

Como se mencionó anteriormente, es discutido si el modelo de 6Hz es o no un modelo de convulsiones resistentes a la acción de los FAEs. Sin embargo el modelo de kindling corneal 6 Hz es indiscutiblemente incluido en este grupo.

En este modelo, ratones de 20 a 30 g de peso son estimulados mediante electrodos corneales usando una intensidad de corriente de 44 mA, 0.2 ms de ancho de pulso, 3 s de duración y 6 Hz de frecuencia de pulso. 15 min antes de la estimulación se coloca una gota de tetracaína 0.5% en los ojos de manera de inducir anestesia local y asegurar una buena conductividad eléctrica.

La estimulación es realizada dos veces al día (de lunes a viernes) con intervalos de 4 horas entre cada estimulación, durante 3 semanas consecutivas. Luego de cada estimulación los animales son observados por 30 s.

En el comienzo del proceso de kindling, los ratones exhiben un comportamiento que incluye movimientos estereotipados, rigidez de la cola e inmovilidad. Después de unos pocos días de estimulación, el 50-60% de los animales comienzan a presentar convulsiones generalizadas. Los ratones son considerados totalmente encendidos cuando presentan convulsiones generalizadas (score 5 de la escala de Racine) al menos 10 veces consecutivas (*Leclercq et al 2014*).

Se espera que al final de la tercera semana de estimulación el 60-70% de los ratones alcance el estado *kindled*, el cual puede ser mantenido con dos estimulaciones diarias dos veces por semana. Los animales que no alcancen este estado luego de las 3 semanas de estimulación pueden seguir siendo estimulados de la misma manera por 2 semanas adicionales. Al final de la 5ta semana el 90% de los animales alcanzan el estado *kindled* (*Leclercq et al 2014*).

2.3- Kindling químico: PTZ kindling

Se utilizan ratones de entre 20 y 25 g de peso al comienzo del experimento. La inyección de PTZ a 35-40 mg/kg (i.p.) día por medio, por un total de 11 administraciones es óptima para inducir el kindling. Inmediatamente después de cada administración de PTZ se realiza la observación visual de los animales durante 15 min para evaluar la incidencia y severidad de las crisis usando una escala de Racine modificada (tabla 2).

Score	Descripción
0	Sin respuesta
1	Inmovilización. Mov. faciales
2	Nooding
3	Sacudidas mioclónicas cortas y clonus bilateral de miembros anteriores
4	Posición de canguro. Crisis clónica generalizada
5	Caída con pérdida de la postura
6	Extensión tónica y muerte

Tabla 2: Escala de Racine modificada para la evaluación de las convulsiones inducidas en el modelo PTZ kindling en ratón.

Los ratones son considerados encendidos después de haber alcanzado al menos tres convulsiones de score 4 ó 5 consecutivas.

Otra alternativa para este modelo es administrando PTZ cada día de la semana durante 2 semanas. El número de animales *kindled*, que consistentemente exhiben convulsiones clónicas luego de la inyección de PTZ es de aproximadamente el 90% a los 15 días de tratamiento (*Ohno et al 2009*).

PTZ kindling también puede realizarse en ratas (150-250 g de peso). En este caso, la dosis usada es de 30-35 mg/kg y puede administrarse una vez por cada día de la semana o día por medio hasta llegar a 10-14 administraciones.

El comportamiento de las ratas es similar al del ratón con algunas diferencias como las sacudidas de perro mojado características en las ratas y ausentes en ratones. Se utiliza la escala de Erakovic (*Erakovic et al 2001, 2003*) para evaluar la severidad de las convulsiones (tabla 3).

Los animales son considerados *kindled* después de haber alcanzado el score 4 ó 5 de la escala al menos tres veces consecutivas (*Ding et al 2014*).

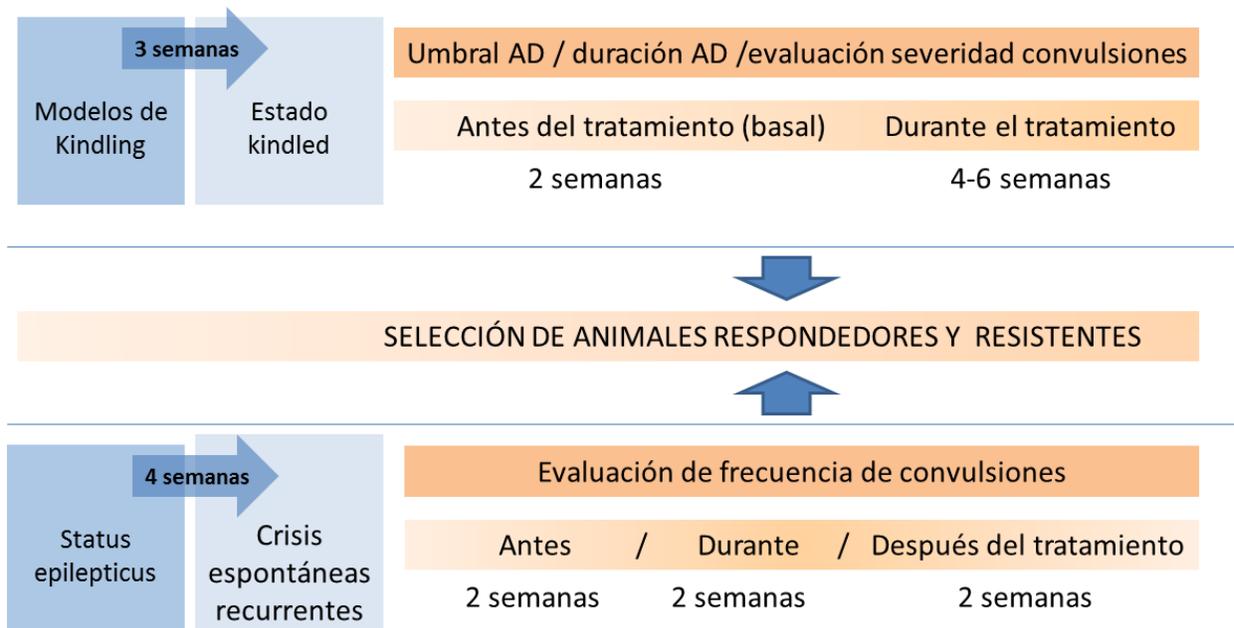
Score	Descripción
0	Sin respuesta
1	Inmovilización. Mov. faciales
2	Sacudidas de perro mojado
3	Sacudidas mioclónicas cortas y posición de canguro
4	Crisis clónica generalizada
5	Episodio de extensión tónica o estatus epiléptico
6	Muerte

Tabla 3: Escala de Erakovic para la evaluación de las convulsiones en el modelo de PTZ kindling en rata.

Resistencia a fármacos en modelos de epilepsia:

A lo largo de este capítulo se han descritos modelos en los que los animales adquieren un comportamiento epiléptico. En algunos casos presentando crisis espontáneas y en otros disminuyendo el umbral convulsivo. En todos estos casos los animales epilépticos pueden, además, presentar un fenotipo resistente a los fármacos. El uso de estos modelos para la evaluación de farmacorresistencia requiere una selección de animales resistentes y sensibles, la cual se realiza mediante administración repetida de un fármaco anticonvulsivante. En los modelos de convulsiones recurrentes espontáneas subsecuentes al estado epiléptico, se evalúa la habilidad del fármaco administrado para anular o disminuir la frecuencia de CERs. Por otro lado, en los modelos de kindling, en los

que los animales no muestran CERs, la severidad de las convulsiones inducidas y la duración y umbral de post descarga son usados como indicadores de eficacia.



En general, los modelos de convulsiones recurrentes espontáneas subsecuentes al SE alcanzan alrededor de un 35% de animales resistentes a fenobarbital (*Bankstahl M & Löscher 2012; Brandt & Löscher 2014*); dicho número es equivalente al porcentaje de no respondedores observado en el escenario clínico. En el modelo de kindling de amígdala este número es menor, entre un 12 y un 23% de los animales resultan resistentes a fenitoína (*Löscher et al 1993, Löscher 2011, Potschka 2012*)

En cuanto a los mecanismos responsables de la farmacorresistencia mencionada, en general involucran la sobreexpresión de proteínas de eflujo, especialmente Pgp.

En animales farmacorresistentes obtenidos del modelo BLA, se ha evidenciado una marcada sobreexpresión de Pgp (*Bartmann et al 2010, Bankstahl JP & Löscher 2008, Rizzi et al 2002, Volk et al 2005*). Van Vliet y colaboradores han encontrado, en este mismo modelo, un incremento en la expresión de transportadores Pgp, MRP1, MRP2 y BCRP en capilares y astrocitos circundantes en corteza piriforme, perirrinal y entorrinal (*Van Vliet et al 2005*). Otros estudios han demostrado sobreexpresión de Pgp en animales epilépticos provenientes de los modelos de pilocarpina y AK (*Volk et al 2005, Bankstahl JP & Löscher 2008, Bauer et al 2008*) pero, desafortunadamente no se han realizado estudios en los que se discrimine entre animales resistentes o respondedores y se correlacione la respuesta o falta de ella con los niveles de expresión de las bombas de eflujo.

También se ha observado un incremento en la expresión de Pgp en regiones límbicas cerebrales de animales *kindled* obtenidos mediante estimulación eléctrica de la amígdala (*Volk et al 2004*). PTZ-kindling también incrementa la expresión y función de Pgp, dando como resultado una disminución de los niveles de fenobarbital a nivel cerebral. La co-administración de ciclosporina A (un modulador de Pgp) incrementa los niveles de fenobarbital en el cerebro y mejora

los efectos anticonvulsivos del mismo, presumiblemente mediante la inhibición de la función de Pgp (*Liu et al 2007*).

También hay reportes vinculados a estos modelos que dan sustento a la hipótesis de la modificación de los blancos moleculares: las ratas *kindled* resistentes a fenobarbital muestran complejas alteraciones cerebrales morfológicas y neuroquímicas, en comparación con las ratas sensibles a fenobarbital (PB), entre las cuales se incluyen la insensibilidad frente a la acción de diazepam de canales GABA_A del giro dentado, y alteraciones en ciertas subunidades de este mismo receptor en la totalidad del hipocampo (*Volk et al 2006, Bethmann et al 2008*).

En el modelo de pilocarpina, el efecto de clonazepam es dramáticamente reducido en células piramidales del área CA1 del hipocampo (81% de reducción respecto al control). De manera similar, el efecto protector de zoldipem se redujo en un 66% en neuronas del giro dentado (*Gibbs et al 1997*). Una combinación de estudios moleculares y funcionales en animales epilépticos provenientes del modelo de pilocarpina indicaron alteraciones en la composición de las subunidades alfa del receptor GABA_A, en particular un decremento de la subunidad $\alpha 1$ y un incremento de la subunidad $\alpha 4$ (*Brooks-Kayal et al 1998*).

Uno de los mecanismos de resistencia a FAEs que se ha propuesto es la alteración en los canales de sodio activados por voltaje. El efecto bloqueante de canales de sodio ha sido estudiado para diferentes fármacos en algunos modelos de epilepsia (tabla 4), mostrando un decremento del efecto de fenitoína,

carbamazepina y lamotrigina en animales kindled o ratas con CERs subsecuentes a SE inducido por pilocarpina.

Sin embargo, en el único estudio en que respondedores y no respondedores fueron discriminados, no se observaron diferencias en el efecto de fenitoína sobre canales de sodio y calcio en neuronas de CA1 entre estos grupos (*Jeub et al 2002*).

Por otro lado, se ha observado una reducción del efecto de lamotrigina y fenitoína en un 64 y 77% respectivamente, sobre neuronas aisladas del giro dentado, en el modelo de pilocarpina. Sin embargo, este efecto no se correlaciona con una disminución de respuesta de fenitoína *in vivo* (*Remy et al 2003a*). La falta de relación entre la resistencia *in vivo* y la reducida sensibilidad de los fármacos sobre corrientes de sodio y calcio podría estar relacionada con la acción de los fármacos en regiones diferentes de la evaluada en el ensayo *in vitro*.

El efecto de valproato como bloqueante de canales de sodio no se ve reducido ni en el modelo de pilocarpina ni en el kindling eléctrico. Estos resultados sugieren que los cambios observados en las corrientes de sodio pueden afectar dramáticamente la sensibilidad a algunos pero no a todos los FAEs. Respecto a esto último, se sabe que lamotrigina, fenitoína y carbamazepina comparten su modo de interacción con los canales de sodio (*Nardi et al 2012*); no obstante, la interacción de valproato con este blanco no se ha estudiado suficientemente.

FAE	Blanco molecular	Modelo de epilepsia	Efecto	Célula	Referencia
Carbamazepina	Canales de sodio operados por voltaje	Pilocarpina	Pérdida del efecto completa y de larga duración	neuronas hipocampales granulares dentadas	Remy et al 2003b
		kindling hipocampal	Disminución del bloqueo relativamente modesto y transitorio	neuronas piramidales CA1	Jeub et al 2002
Valproato		Pilocarpina	Sin cambios	neuronas hipocampales granulares dentadas	Remy et al 2003a
		kindling hipocampal		neuronas piramidales CA1	Jeub et al 2002
Fenitoína		pilocarpina	Reducción del efecto bloqueante	neuronas hipocampales granulares dentadas	Remy et al 2003a
Lamotrigina		pilocarpina	Reducción del efecto bloqueante	neuronas hipocampales granulares dentadas	Remy et al 2003a
Clonazepam		Rc GABA _A postsinápticos	Pilocarpina	Disminución de la modulación positiva	neuronas piramidales CA1
	Incremento de la modulación positiva			neuronas hipocampales granulares dentadas	Gibbs et al 1997
Zoldipem	Disminución de la modulación positiva			neuronas hipocampales granulares dentadas	Gibbs et al 1997

Tabla 4: Efecto de fármacos antiepilépticos sobre canales de sodio o receptores GABA_A en tejido de animales epilépticos.

Relevancia de la severidad intrínseca en modelos de farmacoresistencia

Actualmente no hay consenso en cuanto a cuáles son los indicadores clínicos más representativos de la gravedad de la epilepsia. En la situación clínica,

la severidad de la epilepsia podría ser estimada a través de diferentes factores, incluyendo el tipo de crisis convulsivas, el impacto sobre la calidad de vida, discapacidad, enfermedades concomitantes, la letalidad, la electroencefalografía o biomarcadores como los indicadores de lesión neural. En modelos animales, la medida de la gravedad incluye el inicio temprano de desarrollo de convulsiones, la frecuencia, severidad y duración de las convulsiones y la letalidad entre otros (*Rogawski 2013*).

En el modelo de BLA, se ha observado marcada pérdida bilateral de neuronas en hilio dentado en todos los no respondedores, mientras que esto no fue observado en los respondedores (*Volk et al 2006*). Esta observación en el modelo BLA se correlaciona con la experiencia clínica, ya que la esclerosis del hipocampo en pacientes con TLE conduce a un mal pronóstico (*Cascino 1995*). En otro experimento en el mismo modelo, se observó una elevada frecuencia de las crisis en el 46% de los no respondedores. Sin embargo, el otro 54% demuestra que existen factores distintos a la alta frecuencia de las convulsiones implicados en la resistencia a fármacos en este modelo. Esto está de nuevo en línea con los hallazgos clínicos: pacientes epilépticos que comienzan con pocas convulsiones no siempre responden al tratamiento con FAEs (*Schmidt & Löscher 2009*).

Otra característica de las ratas resistentes es la alteración de su comportamiento: en el modelo BLA se ha observado que las ratas no respondedoras son hiperexcitables y agresivas mientras que las que responden a

los FAEs son normalmente fáciles de manejar sin ningún tipo de alteraciones del comportamiento (*Löscher & Brandt 2010*). Los cambios en el comportamiento se han observado también en los no respondedores del modelo de pilocarpina, en los cuales se observaron diferencias de comportamiento en modelos de ansiedad: las ratas que fueron consideradas respondedoras mostraron menos hiperactividad que las no respondedoras en el modelo de campo abierto. Consistentemente, las no respondedoras muestran una tendencia de aumento de la actividad ambulatoria en el laberinto en cruz elevado y un aumento significativo en la frecuencia de entradas en los brazos cerrados. Por último, en la prueba de pick-up para probar la hiperexcitabilidad del comportamiento, las ratas no respondedoras fueron más sensibles al contacto que las ratas respondedoras (*Brandt et al 2006*).

Por lo expuesto anteriormente, la neurodegeneración del hipocampo, la alta frecuencia de las convulsiones y el comportamiento locomotor hiperactivo se han propuesto como factores de gravedad asociados a farmacorresistencia en ratas epilépticas.

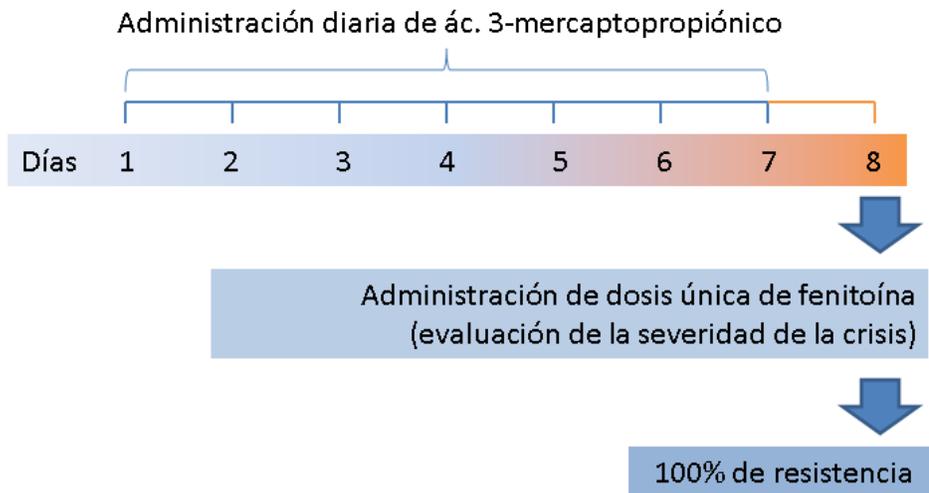
Otros modelos de farmacorresistencia de utilidad en la evaluación de fármacos.

Modelos de convulsiones farmacorresistentes inducidas por ácido 3-mercaptopropiónico (MP).

El modelo del ácido 3-mercaptopropiónico no ha sido identificado como un modelo de epilepsia debido a que no existen reportes que lo evalúen como tal. Sin embargo, la inducción de convulsiones generalizadas diarias mediante la

administración de MP en ratas (40 mg/kg; i.p.) produce una progresiva refractariedad a fenitoína que llega a ser del 100% después de al menos 7 inyecciones (Höcht *et al* 2007) y que está asociada a la sobreexpresión de Pgp (Lazarowski *et al* 2004). Estudios farmacocinéticos en animales tratados con MP indicaron una disminución de los niveles de fenitoína en hipocampo en comparación con animales control, mientras que la administración de nimodipina (bloqueante de Pgp) restaura los niveles normales (Höcht *et al* 2007).

Este modelo tiene la ventaja de inducir farmacoresistencia en pocos días en el 100% de los animales (Lazarowski *et al* 2006). Debido a que no es un modelo de CERs la respuesta a FAEs es evaluada mediante una única administración de antiepiléptico seguida de inducción de crisis, 24 h luego de la última administración de MP.



Modelos genéticos.

En los últimos años se ha incrementado el uso de animales genéticamente modificados en investigación en epilepsia; en paralelo, el número de mutaciones y genes epileptogénicos identificados en humanos está aumentando a un ritmo acelerado (*Katie et al 2015*). Si la intratabilidad de las convulsiones tiene una base genética, los ratones transgénicos que llevan el gen/genes respectivos podrían ser modelos ideales para el desarrollo de fármacos antiepilépticos más eficaces. Los ratones transgénicos y ratones knockout ofrecen la posibilidad de reproducir selectivamente las anormalidades moleculares o celulares que se propone están involucradas en el desarrollo de epilepsia farmacorresistente (*Löscher 1997*). La gran mayoría de los modelos que son utilizados para estudiar las influencias genéticas sobre las convulsiones y la muerte celular inducida por las mismas son modelos de genética inversa en el que buscamos los fenotipos que surgen como resultado de secuencias genéticas particulares. Un gen en particular es identificado en base a su función y participación en la epilepsia humana y entonces se manipula en un ratón.

Los modelos transgénicos son relativamente fáciles de generar y no son muy caros, pero no pueden reproducir las condiciones fisiopatológicas reales tan exactamente como otros modelos (*Katie et al 2015*).

Como el contenido genético de cada cepa puede influir significativamente en la susceptibilidad a las convulsiones o sus consecuencias patológicas, los

resultados de los ratones genéticamente modificados pueden ser difíciles de interpretar; los cambios observados pueden deberse a los genes modificados o a las diferencias en la homogeneidad del contenido genético de cada cepa. Por otra parte, los fenotipos causados por modificaciones genéticas específicas están fuertemente influenciados por los genes no ligados al locus diana (*Schauwecker 2011*).

Modelos *In Vitro* para el estudio de la permeabilidad cerebral.

Debido a la complejidad de los estudios *in vivo* de la permeabilidad de la BHE, han sido desarrollados varios modelos simplificados *in vitro*, incluyendo capilares cerebrales aislados y modelos de BHE monocapa, cocultivo, dinámicos y microfluidos.

Algunos aspectos negativos que limitan el amplio uso de modelos de BHE *in vitro*, tanto en investigación básica como en campañas de screening de fármacos incluyen: (1) su uso es costoso y requiere mucho tiempo, lo que podría dificultar su aplicación habitual en los laboratorios o centros no especializados o con presupuesto limitado; (2) las células endoteliales cerebrales rápidamente se diferencian, perdiendo sus características particulares luego de algunos pasajes; (3) es difícil eliminar las células no endoteliales contaminantes (pericitos, células leptomeníngicas, células de músculo liso) en un cultivo primario. Esto se convierte en una limitación para el estudio de la permeabilidad y el transporte transendotelial porque las células contaminantes con frecuencia provocan un

agujero en la capa, ya que las células endoteliales son incapaces de crecer sobre ellas (*Roux & Couraud 2005*).

Por estas razones, las líneas celulares de origen no cerebral a menudo se utilizan para identificar qué fármacos antiepilépticos son sustratos de transportadores de eflujo; entre ellos, Pgp es claramente el transportador que hasta ahora ha sido más estudiado en modelos *in vitro* (*Zavala & Rocha 2013*).

Se ha demostrado que, entre las diferentes líneas celulares inmortalizadas, las células Madin-Darby de riñón canino (MDCK) transfectadas con Pgp dan la mejor correlación entre ensayos *in vitro* e *in vivo*. Las células MDCK transfectadas con Pgp (*Kuteykin-TePLYakov et al 2010*) y las células Caco-2 tratadas con vinblastina (*Hellinger et al 2010*) tienen una permeabilidad similar a la de los modelos de co-cultivo. Estos datos sugieren que los dos modelos se pueden utilizar en el cribado de alto rendimiento para la identificación de potenciales candidatos (*He et al 2014*).

Los modelos de epilepsia refractaria existentes son una herramienta fundamental en la búsqueda de nuevos fármacos; sin embargo, como puede deducirse de la descripción realizada, tienen serias limitaciones: tiempos largos de tratamiento, alta mortalidad, bajo porcentaje de animales resistentes y algunos de ellos requieren equipamiento especial. Además, hasta ahora no han sido suficientemente caracterizados desde el punto de vista fisiopatológico. Si bien hay varios reportes en los que se han estudiado los cambios fisiológicos y

metabólicos en animales epilépticos, pocos de ellos han hecho una pre-selección de animales respondedores y resistentes que permita el estudio de los mecanismos implicados en la resistencia a los fármacos. Son necesarios más estudios de este tipo para optimizar los modelos existentes.

Por otro lado, en la mayoría de los modelos descritos se utilizan ratas como animal de experimentación, lo cual representa una gran desventaja en la evaluación de nuevos candidatos, ya que el elevado peso de la rata exige administrar (y por ende disponer de) una gran cantidad de los mismos.

Los modelos que utilizan ratones son una estrategia atractiva para la investigación de trastornos neurológicos complejos debido a su disponibilidad, facilidad de manejo y menor costo en comparación con las ratas (Schauwecker, 2011). Además, su peso es menor que el de las ratas, por lo que la cantidad de fármacos candidatos que se debe administrar también es menor. Este hecho disminuye los costos relacionados con la adquisición de los fármacos candidatos.

Teniendo en cuenta las ventajas del uso de ratones como animales de experimentación y partiendo de los antecedentes del uso de MP en rata (con el cual se obtiene un alto porcentaje de farmacoresistencia, ligada a la sobreexpresión de Pgp) se propuso el uso de este agente convulsivante para el desarrollo de un nuevo modelo de convulsiones farmacoresistentes en ratones,

que resulte sencillo y económico y que permita el screening de una cantidad considerable de candidatos en relativamente poco tiempo de evaluación.



Referencias:

Ahmad N, Yow H, Makmor-Bakry M, et al. (2013) Seizure attainment and mortality of mice in kainite-induced status epilepticus. *Int. J Pharm Pharm Sci*, 5(3):145-147.

Bankstahl M, Löscher W. (2012) Inter-individual variation in the anticonvulsant effect of phenobarbital in the pilocarpine rat model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol*, 234(1):70-84.

Bankstahl JP, Löscher W. (2008) Resistance to antiepileptic drugs and expression of P-glycoprotein in two rat models of status epilepticus. *Epilepsy Research*, 82: 70-85.

Bartmann H, Fuest C, La Fougere C, et al. (2010) Imaging of P-glycoprotein-mediated pharmacoresistance in the hippocampus: Proof-of-concept in a chronic rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 51(9):1780-1790.

Barton ME, Klein BD, Wolf HH, et al. (2001) Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. *Epilepsy Research*, 47:217-227

Bauer B, Hartz AM, Pekcec A, et al. (2008) Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling. *Epilepsia*, 73(5):1444-1453.

Bethmann K, Fritschy JM, Brandt C, et al. (2008) Antiepileptic drug resistant rats differ from drug responsive rats in GABAA receptor subunit expression in a model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 31:169-187.

Bialer M, White HS. (2010) Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9:68-82.

Bialer M, Johannessen SI, Levy RH, et al. (2015) Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Twelfth Eilat Conference (EILAT XII). *Epilepsy Research*, 111:85-141.

Boissier JR, Tardy J, Diverres JC. (1960) Une nouvelle methode simple pour explorer l'action 'tranquillisante': Le test de la cheminee. *Med Exp* 3:81-4.

Brandt C, Glien M, Potschka H, et al. (2003) Epileptogenesis and neuropathology after different types of status epilepticus induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats. *Epilepsy Res*, 55:83-103.

Brandt C, Volk HA, Löscher W. (2004) Striking Differences in Individual Anticonvulsant Response to Phenobarbital in Rats with Spontaneous Seizures after Status Epilepticus. *Epilepsia*, 45 (12):1488-1497.

Brandt C, Gastens AM, Sun M, et al. (2006) Treatment with valproate after status epilepticus: effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats. *Neuropharmacology*, 51(4):789-804.

Brandt C, Löscher W. (2014). Antiepileptic efficacy of lamotrigine in phenobarbital-resistant and -responsive epileptic rats: A pilot study. *Epilepsy Research*, 108:1145-1157.

Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin H, et al. (1998) Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat Med*, 10:1166-1172.

Cascino GD. (1995) Clinical correlations with hippocampal atrophy. *Magn Reson Imaging*, 13:1133-1136.

Castel-Branco GL, Alves IV, Figueiredo AC, et al. (2009) The Maximal Electroshock Seizure (MES) model in the preclinical assessment of potential new antiepileptic drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 31(2):101-106.

Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, et al. (1987). The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience*, 23:953-68.

Curia G, Longo D, Biagini G, et al. (2008) The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience Methods*, 172:143-157.

Ding DX, Tian FF, Guo JL, et al. (2014). Dynamic expression patterns of ATF3 and p53 in the hippocampus of a pentylentetrazole-induced kindling model. *Molecular Medicine Reports*, 10:645-651.

Eraković V, Zupan G, Varljen J, et al. (2001) Altered activities of rat brain metabolic enzymes caused by pentylentetrazol kindling and pentylentetrazol -induced seizures. *Epilepsy Research*, 43:165-173.

Eraković V, Župan G, Varljen J, et al. (2003) Pentylentetrazol-induced seizures and kindling: changes in free fatty acids, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activity. *Neurochemistry International*, 42:173-178.

Everett GM, Richard RK. (1944) Comparative anticonvulsive action of 3,5,5-trimethyloxazolidine-2,4-dione (Tridione), dilantin and phenobarbital. *J Pharmac Exp Ther*, 81:402-407.

Freichel C, Ebert U, Potschka H, et al. (2004) Amygdala-kindling does not induce a persistent loss of GABA neurons in the substantia nigra pars reticulata of rats. *Brain Research*, 1025:203-209.

Furtado MdeA, Braga GK, Oliviera JAC, et al. (2002) Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia*, 43(5):37-9.

Gibbs JW 3rd, Shumate MD, Coulter DA. (1997) Differential epilepsy-associated alterations in postsynaptic GABA(A) receptor function in dentate granule and CA1 neurons. *J Neurophysiol*, 77(4):1924-38.

Glien M, Brandt C, Potschka H, et al. (2001) Repeated low-dose " treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developed epilepsy. *Epilepsy Research*, 46:111-9.

Groticke I, Hoffmann K, Löscher W. (2008) Behavioral alterations in a mouse model of temporal lobe epilepsy induced by intrahippocampal injection of kainate. *Experimental Neurology*, 213:71-83.

Hamilton SE, Loose MD, Qi M, et al. (1997) Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13311-6.

He Y, Yao Y, Tsirka S, et al. (2014) Cell-Culture Models of the Blood-Brain Barrier. *Stroke*, 45(8):2514-2526.

Hellinger E, Bakk ML, Póczy P, et al. (2010) Drug penetration model of vinblastine-treated Caco-2 cultures. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41:96-106.

Höcht C, Lazarowski A, Gonzalez NN, et al. (2007) Nimodipine restores the altered hippocampal phenytoin pharmacokinetics in a refractory epileptic model. *Neuroscience Letters*, 413(2):168-172.

ILAE Commission Report. The epidemiology of the epilepsies: future directions. *Epilepsia* 1997; 38: 614-8.

Jeub M, Beck H, Siep E, et al. (2002) Effect of phenytoin on sodium and calcium currents in hippocampal CA1 neurons of phenytoin-resistant kindled rats. *Neuropharmacology*, 42:107-116.

Jones BJ, Roberts DJ. (1968) The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol*, 20:303-304.

Jung ME, Lal H, Gatch MB. (2002). The discriminative stimulus effect of pentylenetetrazol as a model of anxiety: recent developments. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26:429-439.

Kamal M, Shakya AK, Ahsan MJ, et al (2013) Synthesis, anticonvulsant and neurotoxicity evaluation of some newer N-(2-benzoylbenzofuran-3-yl)-3-(substituted)-propanamide analogs. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 13(3):159-65.

Karakaya G, Aytemir MD, Özçelik B, et al (2013) Design, synthesis and in vivo/in vitro screening of novel chlorokojic acid derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 28(3):627-38.

Katie Lidster, John G. Jefferys, Ingmar Blümcke, et al. (2015) Opportunities for improving animal welfare in rodent models of epilepsy and seizures. *Journal of Neuroscience Methods*. doi:10.1016/j.jneumeth.2015.09.007.

Krall RL, Penry JK, White BG, et al. (1978) Antiepileptic Drug Development:II. Anticonvulsant Drug Screening. *Epilepsia*, 19:409-428.

Kuteykin-Teplyakov K, Luna-Tortós C, Ambroziak K, et al. (2010) Differences in the expression of endogenous efflux transporters in *MDR1*-transfected versus wildtype cell lines affect P-glycoprotein mediated drug transport. *Br J Pharmacol*, 160(6):1453-1463.

Lazarowski A, Ramos AJ, García-Rivello H, et al. (2004) Neuronal and glial expression of the multidrug resistance gene product in an experimental epilepsy model. *Cell Mol Neurobiol*, 24(1):77-85.

Lazarowski A, Czornyj L, Lubieniecki F, et al. (2006) Multidrug Resistance (MDR) Proteins Develops Refractory Epilepsy Phenotype. Clinical and Experimental Evidences. *Current Drug Therapy*, 1(3):291-239.

Leclercq K, Matagne A, Kaminski RM. (2014). Low potency and limited efficacy of antiepileptic drugs in the mouse 6 Hz corneal kindling model. *Epilepsy Research*, 108:675-683.

Liu X, Yang Z, Yang J, et al. (2007) Increased P-glycoprotein expression and decreased phenobarbital distribution in the brain of pentylenetetrazole-kindled rats. *Neuropharmacology*, 53:657-663.

Löscher W, Honack D, Fassbender C, et al. (1991) The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylenetetrazol seizure models. *Epilepsy research*, 8(3):171-189.

Löscher W, Rundfeldt C, Hönack D. (1993) Pharmacological characterization of phenytoin-resistant amygdala-kindled rats, a new model of drug-resistant partial epilepsy. *Epilepsy Research*, 15(3):207-219.

Löscher W, Ebert U. (1996) The role of the piriform cortex in kindling. *Progress in Neurobiology*, 50:427-481.

Löscher W, Fiedler M. (1996) The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. VI. Seasonal influences on maximal electroshock and pentylenetetrazol seizure thresholds. *Epilepsy Research*, 25:3-10.

Löscher W. (1997). Animal models of intractable epilepsy. *Prog Neurobiol*, 2:239-58.

Löscher W. (2006) Animal Models of Drug-Refractory Epilepsy. In: Asla Pitkänen, Philip A. Schwartzkroin and Solomon L. Moshé (Eds) *Models of Seizures and Epilepsy*. 1st Edn. Elsevier, Burlington, USA.

Löscher W, Brandt C. (2010) High seizure frequency prior to antiepileptic treatment is a predictor of pharmaco-resistant epilepsy in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 51(1):89-97.

Löscher W. (2011) Critical Review of current animal models of seizure and epilepsy used in discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*, 20:359-368.

Löscher W, Klitgaard H, Twyman RE, et al. (2013). New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Dig. Nature Reviews Drug Discovery*, doi:10.1038/nrd4126.

Lu Y, Xie T, He XX, et al. (2015) Astaxanthin rescues neuron loss and attenuates oxidative stress induced by amygdala kindling in adult rat hippocampus *Neuroscience Letters*, 597:49-53.

Ma X, Liu G, Wang S, et al. (2007). Evaluation of sphingolipids changes in brain tissues of rats with pentylenetetrazol-induced kindled seizures using MALDI-TOF-MS. *Journal of Chromatography B*, 859:170-177.

Mandhane SN, Aavula K, Rajamannar T. (2007) Timed pentylenetetrazol infusion test: A comparative analysis with s.c.PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice. *Seizure*, 16, 636-644.

Mogensen J. (2003) Animal models in neuroscience. In: Jann Hau and Gerald L. Van Hoosier, Jr. (Ed) *Handbook of laboratory animal science*, second edition. volume 2 Animal models. CRC PRESS pp 95-104

Morales JC, Álvarez-Ferradas C, Roncagliolo M, et al. (2014) A new rapid kindling variant for induction of cortical epileptogenesis in freely moving rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8: 200. DOI: 10.3389/fncel.2014.00200.

Nagao Y, Harada Y, Mukai T, et al. (2013) Expressional analysis of the astrocytic Kir4.1 channel in a pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy model. *Front Cell Neurosci*, 7(104):1-10.

Nardi A, Damann N, Hertrampf T, et al. (2012) Advances in Targeting Voltage-Gated Sodium Channels with Small Molecules. *ChemMedChem*, 7:1-30.

Ohno Y, Ishihara S, Terada R, et al. (2009) Preferential increase in the hippocampal synaptic vesicle protein 2A (SV2A) by pentylenetetrazole kindling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390:415-420.

Paxinos G, Franklin KBJ. (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.

Paxinos G, Watson C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th ed., Academic Press, Sydney.

Pitkänen A, Engel J Jr. (2014) Past and present definitions of epileptogenesis and its biomarkers. *Neurotherapeutics*, 11:231-241.

Potschka H. (2012) Animal models of drug-resistant epilepsy. *Epileptic Disord*, 14(3):226-34.

Racine RJ. (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalographic and Clinical Neurophysiology*, 32:281-294.

Reddy DS, Kuruba R. (2013) Experimental Models of Status Epilepticus and Neuronal Injury for Evaluation of Therapeutic Interventions. *Int. J. Mol. Sci*, 14:18284-18318.

Reddy DS, Ramanathan G. (2012) Finasteride inhibits the disease-modifying activity of progesterone in the hippocampus kindling model of epileptogenesis. *Epilepsy & Behavior*, 25:92-97.

Remy S, Urban BW, Elguer CE, et al. (2003a) Anticonvulsant pharmacology of voltage-gated Na⁺ channels in hippocampal neurons of control and chronically epileptic rats. *European Journal of Neuroscience*, 17:2648-2658.

Remy S, Gabriel S, Urban BW, et al. (2003b) A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy. *Ann Neurol*, 53(4):469-479.

Rizzi M, Caccia S, Guiso G, et al. (2002) Limbic seizures induce P-glycoprotein in rodent brain: functional implications for pharmacoresistance. *J Neurosci*, 22(14):5833-9.

Rogawski MA. (2013) The intrinsic severity hypothesis of pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 54(2):33-40.

Roux F, Couraud PO. (2005) Rat Brain Endothelial Cell Lines for the Study of Blood-Brain Barrier Permeability and Transport Functions. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(1):41-58.

Song MX, Deng X, Rao BQ, et al (2016) Design, Synthesis and Evaluation of the Antidepressant and Anticonvulsant Activities of Triazole-Containing Benzo[d]oxazoles. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, en prensa.

Stables JP, Kupferberg HJ. (1997) The NIH Anticonvulsant Drug Development (ADD) Program: preclinical anticonvulsant screening project. In: Avanzini G, Regesta G, Tanganelli P, Avoli M, editors. *Molecular and cellular targets for antiepileptic drugs*. John Libbey & company Ltd. London, Sydney, Montrouge.

Smolders I, Khan GM, Manil J, et al. (1997) NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. *Br J Pharmacol*, 121:1171-9.

Schmidt D, Löscher W. (2009) New developments in antiepileptic drug resistance: an integrative view. *Epilepsy Curr*, 9:47-52.

Schauwecker PE. (2011) The relevance of individual genetic background and its role in animal models of epilepsy. *Epilepsy Research*, 97:1-11.

Seegers U, Potschka H, Löscher W. (2002) Expression of the Multidrug Transporter P-glycoprotein in Brain Capillary Endothelial Cells and Brain Parenchyma of Amygdala-kindled Rats. *Epilepsia*, 43(7):675-684.

Thompson SE, Woodhall GL, Jones RSG. (2007). Depression of glutamate and GABA release by presynaptic GABAB receptors in the entorhinal cortex in normal and chronically epileptic rats. *Neurosignals*, 15:202-16.

Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, et al. (2015) A definition and classification of status epilepticus - Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*, 56(10):1515-1523.

Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, et al. (1983) Limbic seizures produced by pilocarpine I rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res*, 9: 315-35.

Turski WA, Cavalheiro EA, Bortolotto ZA, et al. (1984) Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. *Brain Res*, 32:237-53.

Turski L, Ikonomidou C, Turski WA, et al. (1989) Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse*, 3:154-71.

Ugale VG, Bari SB. (2016) Structural Exploration of Quinazolin-4(3H)-ones as Anticonvulsants: Rational Design, Synthesis, Pharmacological Evaluation, and Molecular Docking Studies. *Arch Pharm (Weinheim)*, en prensa.

Van Vliet EA, Redeker S, Aronica E, et al. (2005) Expression of multidrug transporters MRP1, MRP2, and BCRP shortly after Status Epilepticus, during the latent period, and in chronic epileptic rats. *Epilepsia*, 46(10):1569-1580.

Volk HA, Potschka H, Löscher W. (2004). Increased expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in limbic brain regions after amygdala-kindled seizures in rats. *Epilepsy Research*, 58(1):67-79.

Volk HA, Löscher W. (2005). Multidrug resistance in epilepsy: rats with drug-resistant seizures exhibit enhanced brain expression of P-glycoprotein compared with rats with drug-responsive seizures. *Brain*, 128:1358-1368.

Volk HA, Potschka H, Löscher W. (2005) Immunohistochemical Localization of P-glycoprotein in Rat Brain and Detection of Its Increased Expression by Seizures Are Sensitive to Fixation and Staining Variables. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 53(4): 517-531.

Volk HA, Arabadzisz D, Fritschy JM, et al. (2006) Antiepileptic drug-resistant rats differ from drug responsive rats in hippocampal neurodegeneration and GABAA receptor ligand binding in a model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 21:633-646.

Williams PA, White AM, Clark S, et al. (2009). Development of spontaneous recurrent seizures after kainite induced status epilepticus. *Neurosci*, 29(7):2103-2112.

White HS, Smith-Yockman M, Srivastava A, et al. (2006) Therapeutic assays for the identification and characterization of antiepileptic and antiepileptogenic drugs. In: Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé SL, editors. *Models of seizures and epilepsy*. Elsevier: Amsterdam.

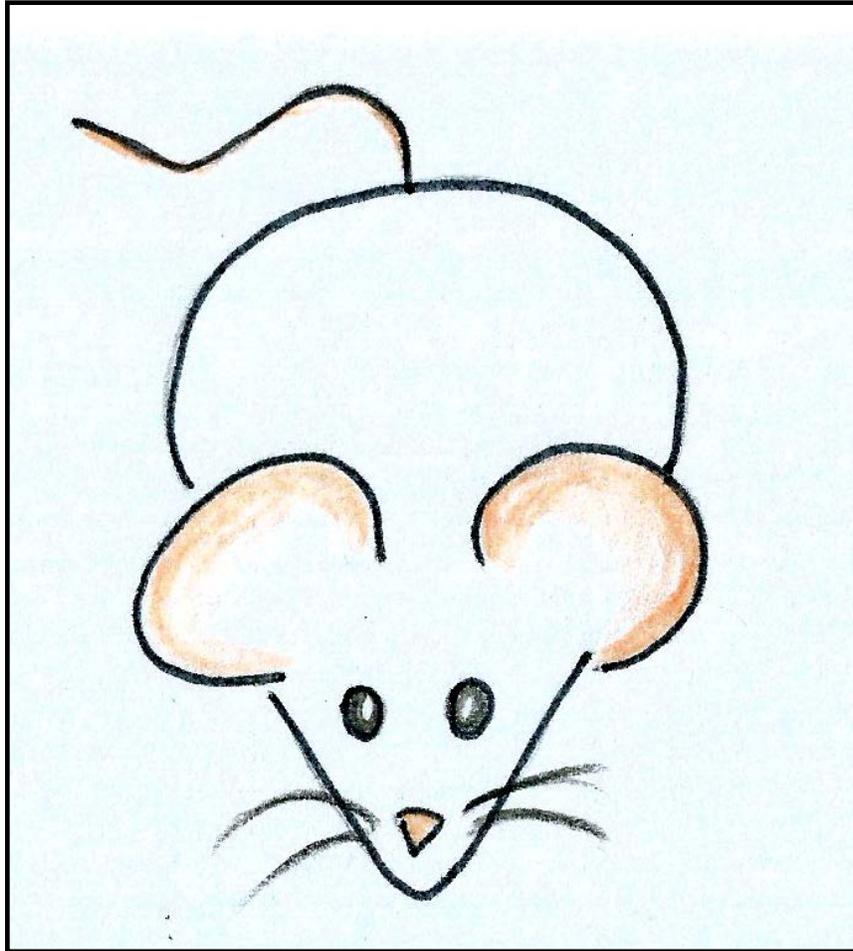
Yang J, Woodhall GL, Jones RSG. (2006). Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic NR2B-containing NMDA receptors is increased in the entorhinal cortex of chronically epileptic rats. *J Neurosci*, 26:406-10.

Zavala-Tecuapetla C, Rocha L. (2013) Experimental Models to Study Pharmacoresistance in epilepsy. In Rocha L, Cavalheiro EA (eds.) *Pharmacoresistance in Epilepsy: From Genes and Molecules to Promising Therapies*. Springer, New York Heidelberg Dordrecht.

Zhang XM, Zhu J. (2011). Kainic Acid-Induced Neurotoxicity: Targeting Glial Responses and Glia-Derived Cytokines. *Curr Neuropharmacol*, 9(2): 388-398.

CAPÍTULO IV

Metodología y resultados I:



Desarrollo y validación del modelo

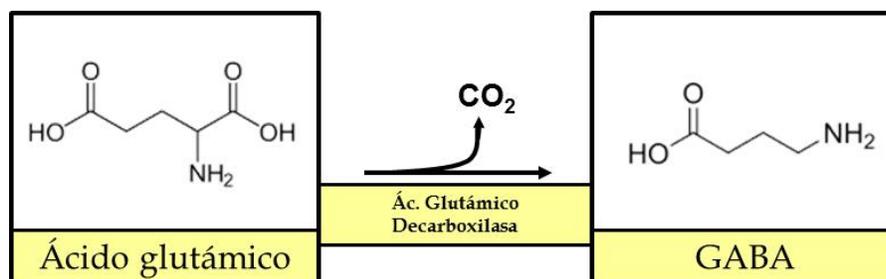
Capítulo IV

Metodología y resultados I:

Desarrollo y validación del modelo

De acuerdo a lo expuesto en capítulos anteriores, se presenta aquí, el desarrollo de un nuevo modelo de evaluación de convulsiones farmacorresistentes en ratones. Dicho modelo, denominado modelo MP, permite el screening inicial de fármacos anticonvulsivantes diseñados para superar la farmacorresistencia mediada por sobreexpresión de Pgp. Se desarrolla a continuación la metodología aplicada y los resultados obtenidos.

El ácido 3-mercaptopropiónico (MP) es un inhibidor de la enzima GAD (ácido glutámico descarboxilasa), la cual cataliza la conversión del neurotransmisor excitatorio ácido glutámico en el neurotransmisor inhibitorio ácido γ -aminobutírico (GABA) (Rodríguez de Lores Arnaiz *et al* 1973).



La inhibición de esta enzima da como resultado una disminución de los niveles de GABA y un aumento de los niveles de glutamato, que se manifiesta con la inducción de convulsiones generalizadas características, mayormente de tipo clónicas.

Utilizamos este agente convulsivante para el desarrollo de un modelo de convulsiones farmacorresistentes en ratón por sus ventajas demostradas en el modelo en rata (ver capítulo III): induce convulsiones de alta severidad con baja mortalidad, presenta un alto porcentaje de animales farmacorresistentes a fenitoína (PHT), no requiere cirugía ni monitorización continua e induce sobreexpresión de Pgp.

A partir de estos antecedentes hemos desarrollado y validado un modelo de inducción de crisis diarias, en ratones, mediante la administración de MP. Como resultado se obtienen animales resistentes a la acción de fármacos antiepilépticos clásicos sustratos de Pgp.

Desarrollo y validación del modelo

Animales

En todos los experimentos se utilizaron ratones NIH: Swiss adquiridos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP y alojados en el bioterio del LIDeB, desde el momento del destete hasta que llegan a pesar entre 25 y 30 g (aproximadamente 2 semanas).

El estrés por la manipulación aguda induce la regulación negativa de los receptores de GABA, lo que podría afectar la susceptibilidad a las crisis convulsivas (*Skilbeck et al 2010*). Por este motivo, durante la última semana del período de adaptación los animales fueron administrados con 0,1 ml (i.p.) de solución fisiológica, todos los días, con el objeto de para minimizar el impacto del estrés al comienzo de los experimentos.

Los animales fueron ubicados en cajas de acrílico de 35 x 32 x 12 cm, en grupos de 10 animales como máximo, bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 hs, en un ambiente climatizado. Fueron provistos de alimento balanceado y agua acidulada *ad libitum*. Durante los experimentos, los animales fueron dispuestos en cajas individuales para su observación.

El cuidado de los animales, en este protocolo experimental, se llevó a cabo de acuerdo a las directrices del NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), el cual ha expedido el certificado de aprobación de protocolo N° 012-16-16.

Fármacos

Todas las soluciones utilizadas fueron preparadas en el momento previo a su utilización.

MP fue adquirido en Merck (Hohenbrunn, Alemania). Levetiracetam (LEV) fue proporcionado por GlaxoSmithKline. Carbamazepina (CBZ) y Nimodipina

(NIMO) fueron donados por Laboratorios Bagó. Diazepam (DZP) fue adquirido en Roche, Fenobarbital (PB) en Serva (Heidelberg, Alemania) y Fenitoína (PHT) en Sigma-Aldrich.

MP se preparó a diario en solución salina (5 ml/kg) y se neutralizó con Trizma base 2N. PHT se disolvió en solución salina ajustando el pH a 11,2 con NaOH. Carboximetilcelulosa 1% (CMC) se utilizó como vehículo para CBZ, NIMO y PB. Finalmente, DZP y LEV se disolvieron en solución salina.

Todos los FAEs fueron evaluados a su tiempo de efecto máximo (TEM), administrando las distintas concentraciones en un volumen de 10 ml/kg.

1| Determinación de la dosis de MP:

Con el objetivo de conocer la dosis de MP que induce convulsiones sin provocar la muerte de los animales se realizó una única administración de 4 dosis diferentes de MP: 27, 30, 33 y 35 mg/kg; i.p. (n=4). Luego de la administración los animales fueron observados durante 30 min. Se evaluó el porcentaje de animales que presentaron convulsiones generalizadas y el porcentaje de animales que murieron como consecuencia de la misma.

Resultados:

Dosis (mg/kg)	% convulsión generalizada	% muerte
27	41.66	0
30	100	0
33	100	50
35	100	50

Las dosis de 27 y 30 mg/kg fueron administradas durante 4 días consecutivos durante los cuales se mantuvieron los porcentajes de convulsión generalizada y de supervivencia.

La dosis escogida para el desarrollo del modelo fue la de 30 mg/kg por generar el mayor número convulsiones generalizadas con la menor mortalidad.

En experimentos subsiguientes se observó que, a partir del día 10 de tratamiento, los animales manifestaban una disminución del grado o *score* convulsivo (ver escala utilizada en la próxima sección). Por lo tanto, la dosis de MP fue incrementada gradualmente (de a 0,2 mg/kg), cada vez que se vio disminuida la respuesta convulsiva, empezando con 30 mg/kg en el día 1 y terminando con 36 mg/kg en el día 23 (Fig. 1).

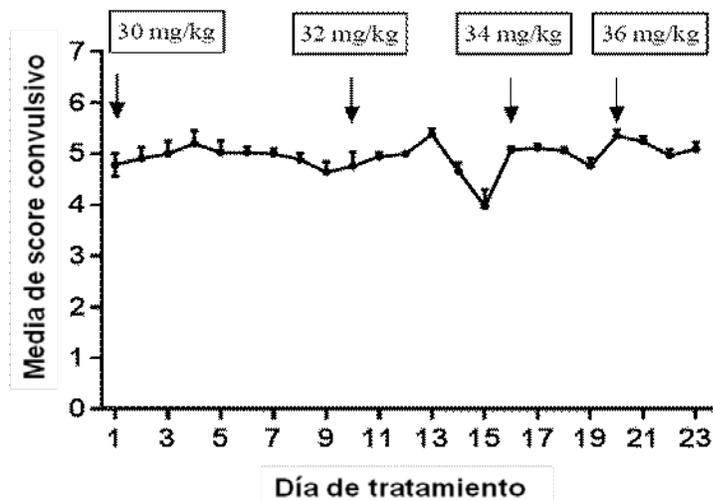


Figura 1: Regulación de la dosis de MP según respuesta convulsiva en los 23 días de tratamiento.

2| Caracterización de las convulsiones:

La actividad convulsiva fue clasificada de acuerdo a una adaptación de la escala de Racine (*Racine 1972*):

Score	Manifestaciones observadas	Tipo de crisis
1	Piloerección - masticación - guiño - nooding - mov. de bigotes	Crisis mioclónicas
2	Mioclónías - contracción de la cola	
3	Movimientos clónicos de miembros anteriores	Crisis clónica parcial
4	Posición de canguro	Crisis clónicas generalizadas
5	Movimientos clónicos de miembros anteriores y posteriores con pérdida de postura	
6	Corrida repentina en círculo	
7	Extensión tónica de miembros posteriores	Crisis tónico-clónica generalizada

Resultados:

Luego de la administración de MP se observan mioclonías (*score* 2) con una latencia de $3,11 \pm 0,55$ min. Posteriormente los animales presentan convulsiones clónicas generalizadas (*score* 5) con una latencia de $4,52 \pm 0,94$ min. Estas convulsiones suelen evolucionar a corrida repentina (*score* 6) y, en el 10% de los animales se observan convulsiones tónico-clónicas (*score* 7). Manifestaciones correspondientes a *score* 3 y 4 pueden observarse ocasionalmente, sobre todo cuando los animales reciben algún tratamiento antiepiléptico.

3| Determinación del tiempo de tratamiento.

Definiremos el tiempo de tratamiento como el tiempo necesario para conseguir el mayor porcentaje de animales farmacorresistentes con la menor mortalidad posible.

Se evaluó la farmacorresistencia frente a fenitoína (PHT), un FAE clásico, bloqueante de canales de sodio voltaje dependientes, que ha sido caracterizado como sustrato de Pgp (*Stepien et al 2012; Zhang et al 2012*).

Aunque se sabe que la PHT es capaz de proteger de las crisis tónico-clónicas generalizadas (*Ramsay & DeToledo 1997*), no existen reportes de la evaluación de la actividad de PHT frente a las convulsiones inducidas por MP en ratones, de manera que fue necesario caracterizar las convulsiones observadas en presencia del FAE y la determinación de la dosis que ejerce el máximo efecto.

Se administró a los animales PHT 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 mg/kg i.p. (n=3). 2 h después (TEM) se administró MP 30 mg/kg i.p. Los animales fueron observados durante 30 min. Se registró la presencia de cada una de las fases de la escala mencionada.

Resultados:

Los animales tratados con PHT 6 mg/kg presentaron un comportamiento similar a los animales sin tratamiento en 2 de los 3 animales. Los tratamientos con 9, 12, 15, 18 y 21 mg/kg disminuyeron la severidad de las crisis de una manera dependiente de la dosis. La dosis de 24 mg/kg no presentó protección frente a MP, por el contrario, 2/3 animales presentaron estatus epiléptico (Fig.2).

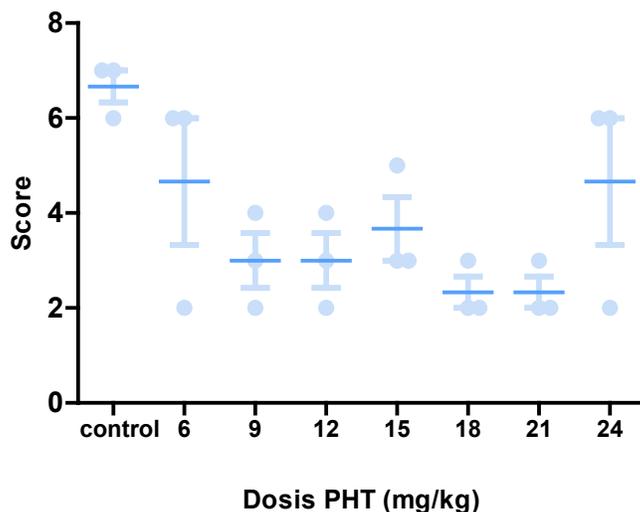


Figura 2: Evaluación de la actividad de PHT frente a convulsiones inducidas por MP.

Se consiguió la máxima protección con dosis de 18 y 21 mg/kg, no habiendo diferencias entre ellas. Los animales presentan crisis clónica parcial en 1 de cada 3 casos, y ninguno presentó crisis generalizada. Por lo tanto, se fijó como criterio de protección la ausencia de *score* 4, la primera manifestación de las crisis generalizadas.

La dosis elegida para realizar los siguientes experimentos fue la de 18 mg/kg por ser la menor dosis que produce el máximo efecto.

Para determinar el tiempo de tratamiento necesario para desarrollar resistencia a PHT, se administró a los ratones MP a dosis convulsivante i.p., una vez al día durante 7, 10, 13, 19 ó 23 días consecutivos. Para 19 y 23 días las administraciones se realizaron de lunes a viernes, esquema de administración utilizado en adelante.

24 horas después de la última administración de MP se administró PHT 18 mg/kg, i.p., y 2 horas después, MP a dosis convulsivante i.p. Los animales fueron observados durante 30 min. Se registró la presencia de cada una de las fases de la convulsión. Se consideraron resistentes aquellos animales que presentaron fase 4 o mayor.

Resultados:

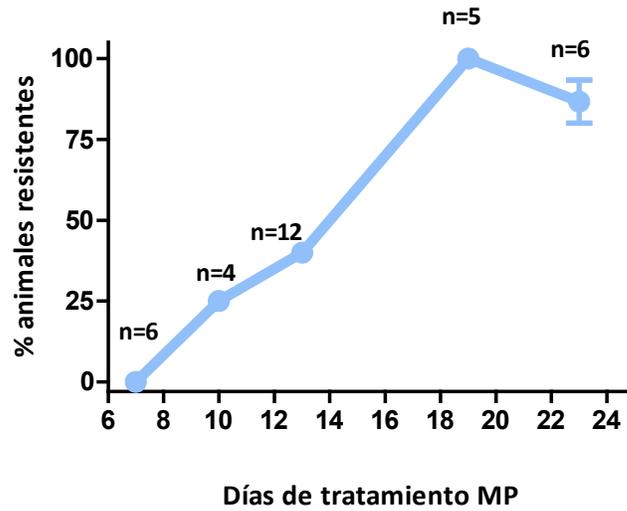


Figura 3: Resistencia a PHT a distintos tiempos de tratamiento con MP.

Como se observa en la figura 3, el mayor número de resistencia se observó después de 19 días de administración de MP. Sin embargo, luego de 23 días de administración de MP, se observó una mayor severidad de las crisis (fig.4).

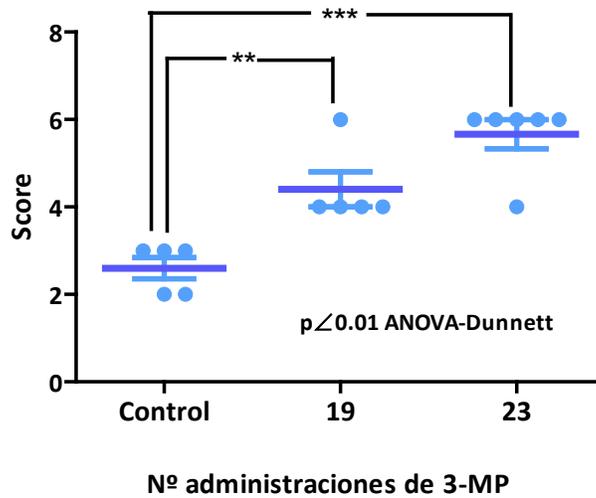


Figura 4: Severidad de las convulsiones inducidas con MP, luego de la administración de PHT, en animales tratados con MP durante 19 y 23 días.

En base a los resultados, elegimos 23 días como tiempo de tratamiento para obtener animales resistentes a PHT.

Para el tiempo de tratamiento de 23 días se realizaron 3 experimentos independientes, con un n=6 para cada uno, obteniéndose una media de animales farmacorresistentes de $86,7 \pm 6,7\%$. A lo largo del tratamiento los ratones adquieren un comportamiento hiperexcitable y agresivo, registrándose además una pérdida de peso del $8 \pm 1,26\%$.

4| Sobreexpresión de Pgp en animales tratados con MP durante 23 días.

Los animales tratados con MP durante 23 días adquirieron resistencia a la acción de la PHT. Se postuló que esta resistencia podría deberse a la sobreexpresión de Pgp como resultado de las repetidas convulsiones inducidas. Para comprobar la sobreexpresión de Pgp se realizaron estudios de western blot e inmunohistoquímica en cerebro de animales administrados con MP o salina durante 23 días consecutivos. Se utilizaron los siguientes grupos experimentales:

Grupo MP23 (N=22): Los ratones fueron administrados con MP durante 23 días. 24 h después de la última administración, fueron sacrificados por dislocación cervical. 4 de ellos fueron usados para estudios de inmunohistoquímica. Los 18 ratones restantes fueron usados para estudios de western Blot.

Grupo control (N=22): Los ratones fueron administrados con solución salina durante 23 días. 24 h después de la última administración, fueron

sacrificados por dislocación cervical. 4 ratones fueron usados para estudios de inmunohistoquímica y 18 ratones para estudios de western blot.

4.1 | Evaluación de expresión de Pgp mediante inmunohistoquímica.

Esta técnica fue aplicada como se describió previamente (*Gori & Girardi, 2013*) con ciertas modificaciones.

Los cerebros fueron removidos e inmediatamente embebidos en 1,2-dicloroetano (Merck Millipore) y rápidamente congelados en hielo seco. Los cerebros congelados fueron mantenidos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por al menos 24 h. Se cortaron secciones coronales ($20\text{ }\mu\text{m}$) con criostato Leica CM 1850, las cuales fueron montadas en portaobjetos gelatinizados y fijadas con acetona fría por 10 min.

Los cortes de cerebro de ratones tratados y control fueron procesados de la misma manera para inmunohistoquímica Pgp-170 (170 refiere al peso molecular, en KDa, de la proteína Pgp). Para inhibir la actividad peroxidasa endógena, los cortes fueron incubados en 0,5% v/v H_2O_2 en buffer fosfato salina (PBS) por 30 min a temperatura ambiente. Las secciones cerebrales fueron bloqueadas durante 1 h con suero de oveja 3% v/v y triton 0,3% v/v en PBS, luego fueron incubadas por 24 hs a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con anticuerpo monoclonal primario anti Pgp-170 1:100. Fueron utilizados dos anticuerpos monoclonales Pgp-170, C219 (Calbiochem) y C494 (Signet Laboratories, Dedham, MA) por separado. Después de lavar con PBS-X (PBS + Triton X-100 5%) los cortes fueron incubados durante 1 h a temperatura

ambiente con anticuerpo secundario biotinilado (Sigma- Aldrich) 1:100 y luego, 1 h con complejo estreptavidina- peroxidasa (Sigma-Aldrich). La reacción fue llevada a cabo con 3,3-diaminobenzidina 0,035% p/v más sulfato de amonio níquel 2,5% p/v y H₂O₂ 0,1% v/v en buffer acetato. Los cortes fueron secados y cubiertos con cubre objeto usando DPX (Fluka) como medio de montaje y se observaron en un microscopio óptico.

Simultáneamente se procesaron controles negativos mediante omisión del anticuerpo primario.

Todos los anticuerpos, así como el complejo estreptavidina-peroxidasa, fueron disueltos en PBS conteniendo suero normal de oveja 1% v/v y triton X-100 0,3% v/v, a pH 7,4.

Las imágenes de las secciones fueron obtenidas usando un microscopio Axiophot Zeiss equipado con una cámara de video (Olympus Q5) y fueron analizadas con software ImageJ (National Institute of Health, USA). La resolución de cada pixel fue 256 (8 bits).

Los valores mostrados representan la media de 4 ratones por cada condición experimental. Se midió el porcentaje de superficie marcada en veinte a veinticinco campos de cada región. Los resultados se expresan como media \pm SEM. Las regiones medidas incluyen la totalidad del hipocampo, la corteza cerebral y el cuerpo estriado. Se utilizaron imágenes con magnificación de 100X para la cuantificación.

Se realizó una comparación estadística del porcentaje de área marcada (media \pm SEM) usando prueba t de Student. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

Alternativamente, algunos cortes de cerebro de ratones MP23 y controles fueron incubados, luego del anticuerpo primario, con anticuerpo secundario antimouse conjugado con fluoresceína 1:100 (Sigma-Aldrich F9006) por 2 horas y luego con yoduro de propiodio (Sigma - Aldrich; 2.5 μ g/ml) por 1 h para la tinción de los nucleos. Luego, los cortes fueron lavados con PBS y los cubreobjetos fueron colocados usando medio de montaje para fluorescencia (Vectashield H-1000).

Resultados:

La inmunoreactividad a Pgp en el grupo control fue débilmente positiva en vasos sanguíneos de corteza cerebral, hipocampo y cuerpo estriado (Fig. 5B, Fig.6-8). Las secciones de ratones MP23 mostraron, en cambio, una intensa inmunoreactividad en vasos sanguíneos de las mismas secciones. Corteza parietal, piriforme y perirrinal fueron intensamente marcadas mostrando un incremento de la reactividad del 1025% en la corteza cerebral total, siendo más intensa en las capas 3 a 5. El hipocampo mostró inmunoreactividad en todas las subáreas con 508% de incremento mientras que para cuerpo estriado el incremento fue del 2700% respecto del control ($p < 0,001$ en todos los casos) (Fig. 5-8).

Los resultados de inmunoreactividad fueron idénticos para los anticuerpos C494 y C219. Todas las figuras mostradas en esta tesis son de tinción con C219.

Los dos anticuerpos secundarios utilizados mostraron resultados similares.

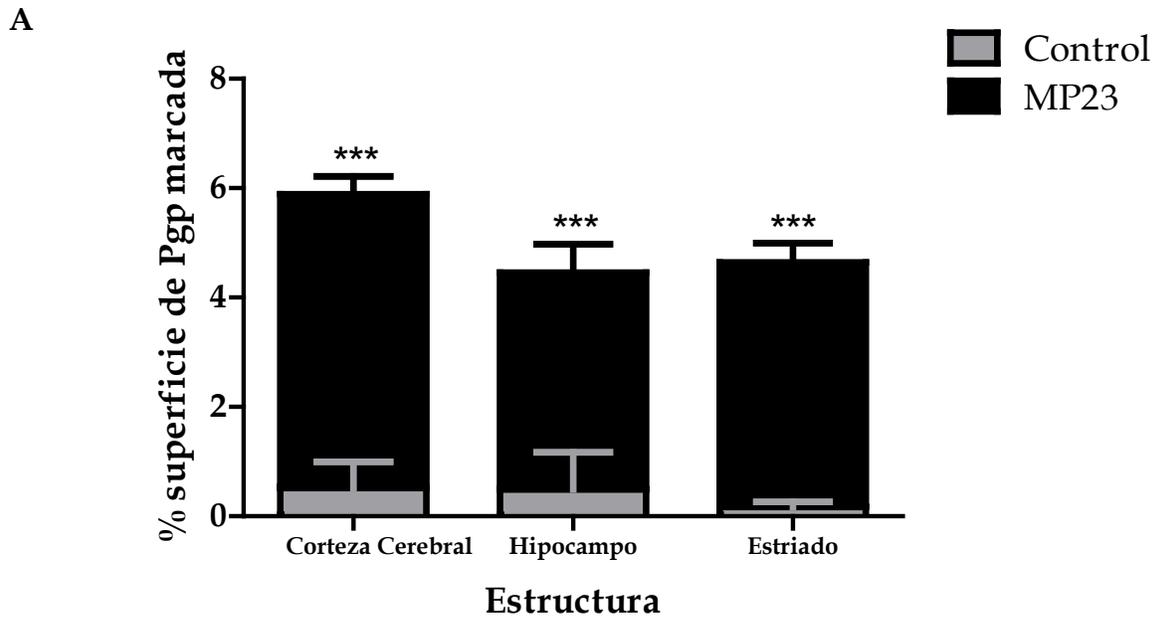


Figura 5A: Expresión de Pgp en corteza cerebral, hipocampo y cuerpo estriado por inmunohistoquímica. Cuantificación de superficie marcada. Se graficó el porcentaje de superficie marcada en animales MP23 y control. *** $p < 0,001$.

B

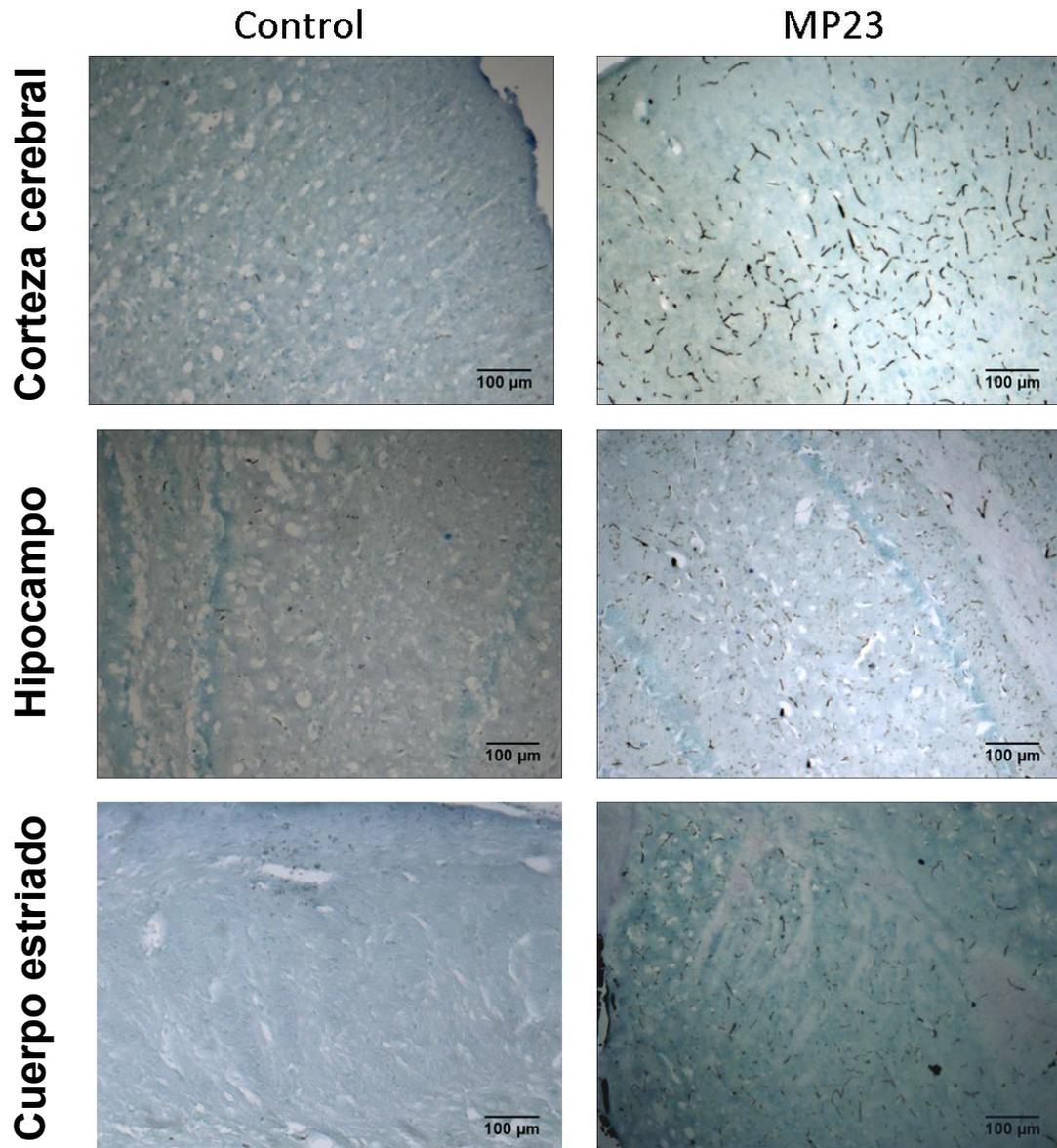


Figura 5B: Expresión de Pgp en corteza cerebral, hipocampo y cuerpo estriado por inmunohistoquímica. Imágenes de inmunotinción en diferentes áreas cerebrales en animales MP23 y controles. (Aumento 100X). Las imágenes corresponden a corteza cerebral parietal, subarea hipocampal CA1 y cuerpo estriado.

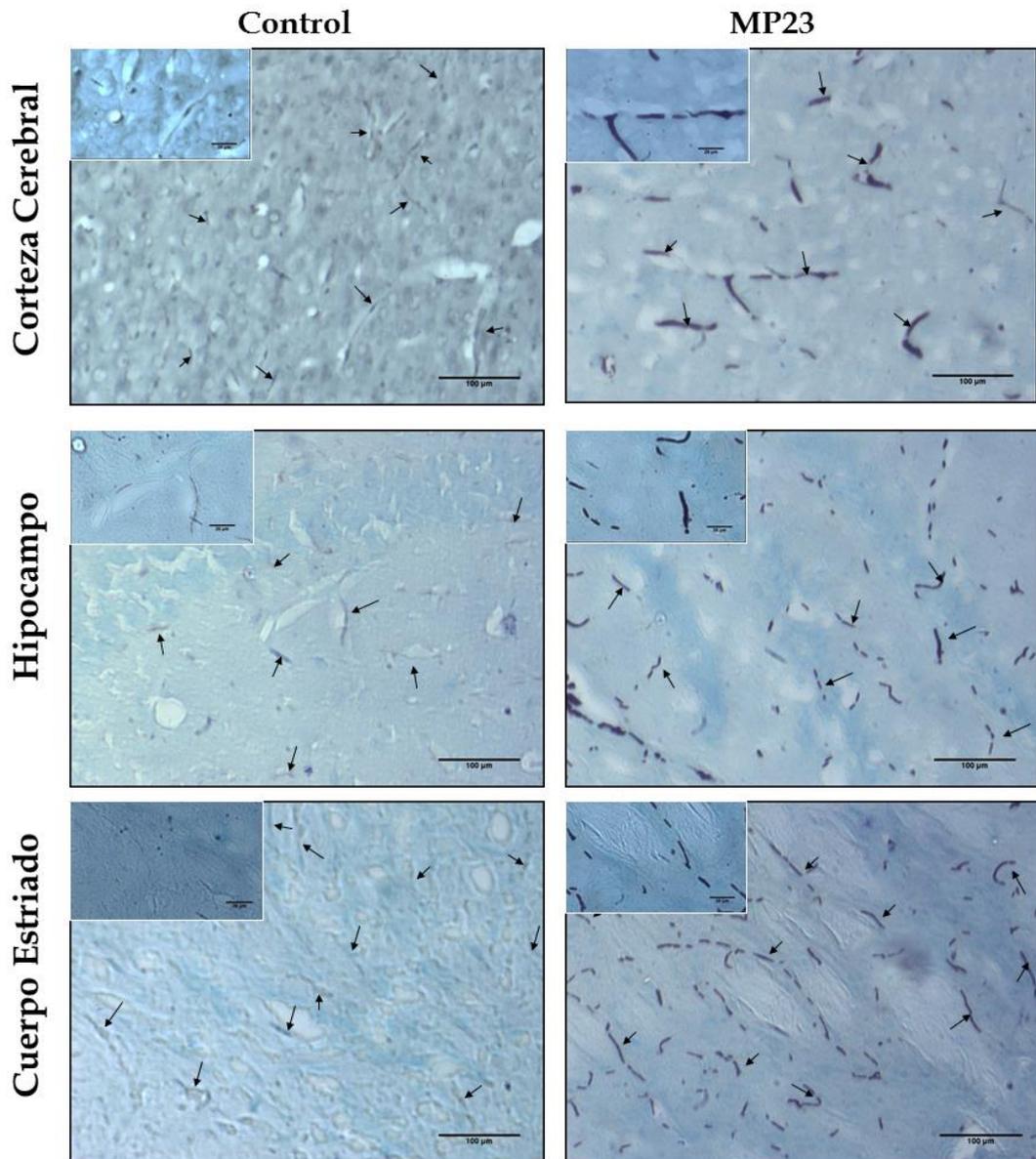


Figura 6: Expresión de Pgp en corteza cerebral, hipocampo y cuerpo estriado por inmunohistoquímica. Aumento: 200X. Las flechas indican capilares teñidos. Los recuadros muestran una ampliación de 400X.

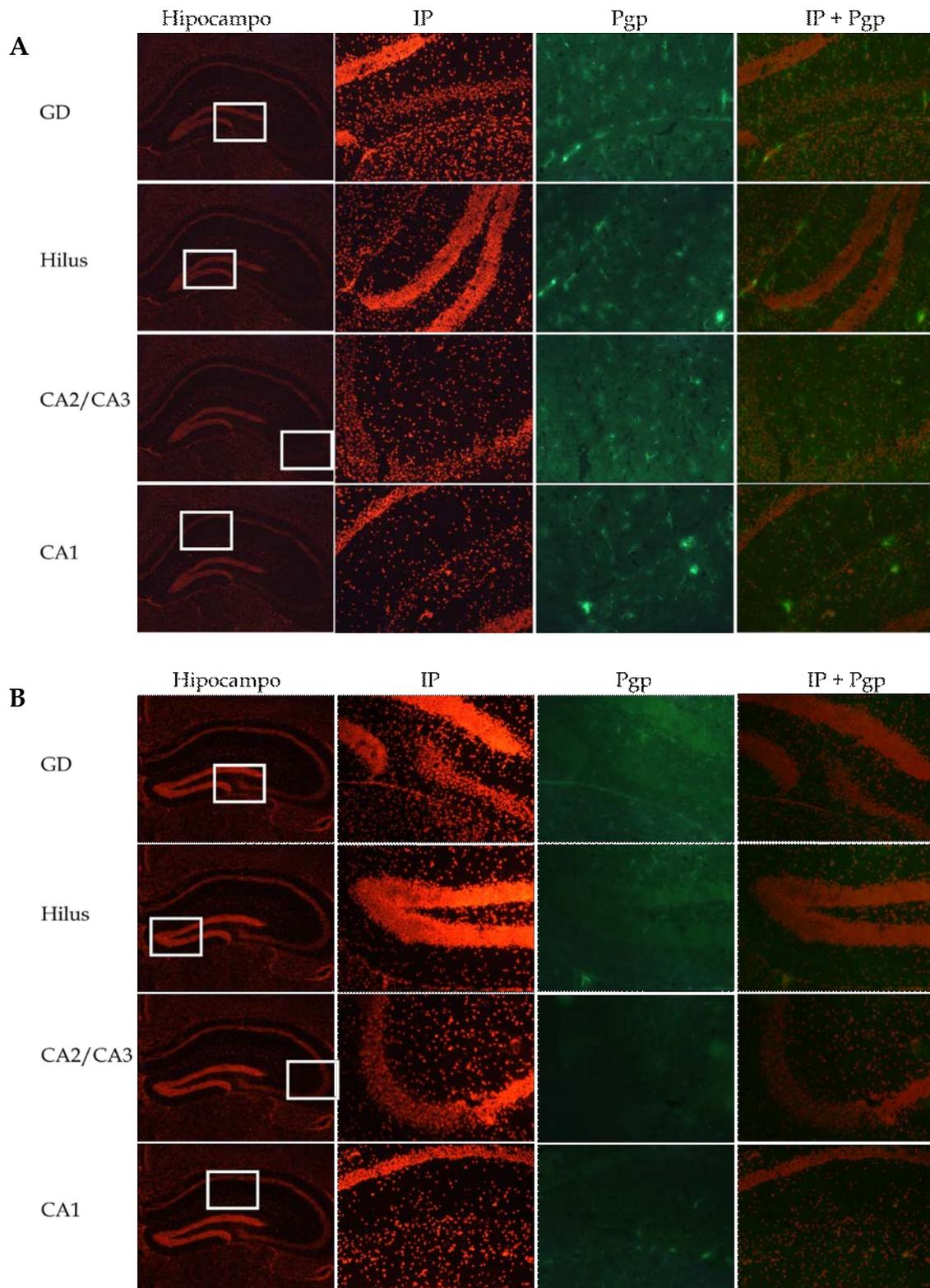


Figura 7: Expresión de Pgp en diferentes regiones del hipocampo. Aumento: 100X. A) Control B) MP23.

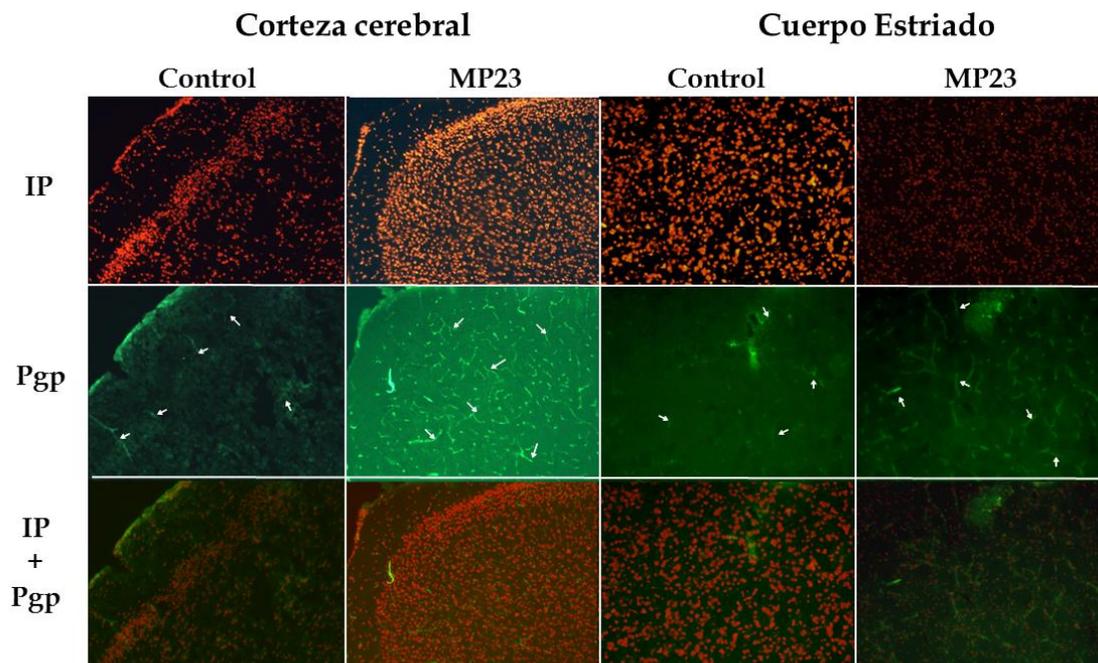


Figura 8: Expresión de Pgp en corteza cerebral y cuerpo estriado de animales MP23 y control. Aumento: 100X.

4.2 | Evaluación de expresión de Pgp mediante western blot

Para los estudios de western blot, se separaron hipocampo, cuerpo estriado y corteza cerebral, los cuales fueron homogeneizados en ambiente frío en una solución de sacarosa 0,32 M neutralizada con solución de trizma base (0,2 M) a pH 7,2 con agregado de coctel inhibidor de proteasas al 10% p/v (0,05 ml/g de tejido), utilizando un homogenizador Potter-Elvehjem. Los homogeneizados fueron centrifugados a 900 xg por 10 min a 4°C. Los sobrenadantes fueron centrifugados a 100000 xg por 30 min. Los sedimentos resultantes conteniendo las membranas crudas fueron resuspendidos en Tris-HCl 20 mM, sacarosa 0,25M y EDTA 0,5 mM

(Auzmendi *et al* 2009). Luego se determinó la concentración de proteínas usando reactivo de Bradford (Sigma) y albúmina de suero bovino como estándar (Bradford, 1976).

Alícuotas de muestras de tejido fueron diluidas con un volumen de buffer de muestra con dodecilsulfato sódico (SDS) y desnaturalizadas a 100 °C. El volumen correspondiente a 30 µg de proteínas fue sembrado en cada línea de un gel SDS-PAGE 8 %. Luego de la separación para la resolución de las proteínas, los geles fueron electrotransferidos en membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Amersham Hybond-P GE Healthcare). Las membranas fueron bloqueadas con 4% de leche en polvo descremada y 2% de glicina en PBS-T (PBS-Tween 0,05%) y luego incubados con anticuerpo anti-Pgp C219 (1:300; Calbiochem) a 4°C por 24 hs. Luego de tres lavados con PBS-T las membranas fueron incubadas con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (1:500 Amersham GE Healthcare) en PBS, por 1h y, luego 3 lavados con PBS-T. Para visualizar la inmunoreactividad, las membranas fueron incubadas con el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL (Pierce ECL Thermo Scientific, Rockford, Estados Unidos) y expuestas a películas de rayos X (Agfa, Argentina). Las películas fueron escaneadas.

Como control de carga de proteína, se utilizó un anticuerpo anti- α -actina policlonal (Sigma) a una dilución 1: 1000 en las mismas membranas después de

remover (*stripping*) el anticuerpo Pgp-170 con una solución de β - mercaptoetanol, SDS 2% y buffer Tris/HCl (pH 6,7) a 50°C durante 30 min.

En las mismas membranas se determinó, además, la expresión de BCRP. Luego de remover el anticuerpo anti- α -actina y bloquear nuevamente las membranas, se incubaron con anticuerpo anti-BCRP BXP-32 (1:300; Kamiya Biomedical Company, Seattle, WA) a 4°C por 24 hs. Luego de tres lavados con PBS-T las membranas fueron incubadas con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (1:500 Amersham GE Healthcare) en PBS, por 1h y, luego 3 lavados con PBS-T. Para visualizar la inmunoreactividad, las membranas fueron incubadas con el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL (Pierce ECL Thermo Scientific, Rockford, Estados Unidos) y expuestas a películas de rayos X (Agfa, Argentina). Las películas fueron escaneadas.

La densitometría de las bandas inmunorreactivas se realizó utilizando el software Image Studio Lite y se normalizó con la señal de actina en las mismas membranas. Los valores representan las medias de 9 muestras (pools de 2 ratones) por cada condición experimental.

Los resultados fueron expresados como media \pm SEM del porcentaje de incremento respecto de los controles. La comparación estadística se realizó mediante prueba t de Student. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

Resultados:

Expresión de Pgp

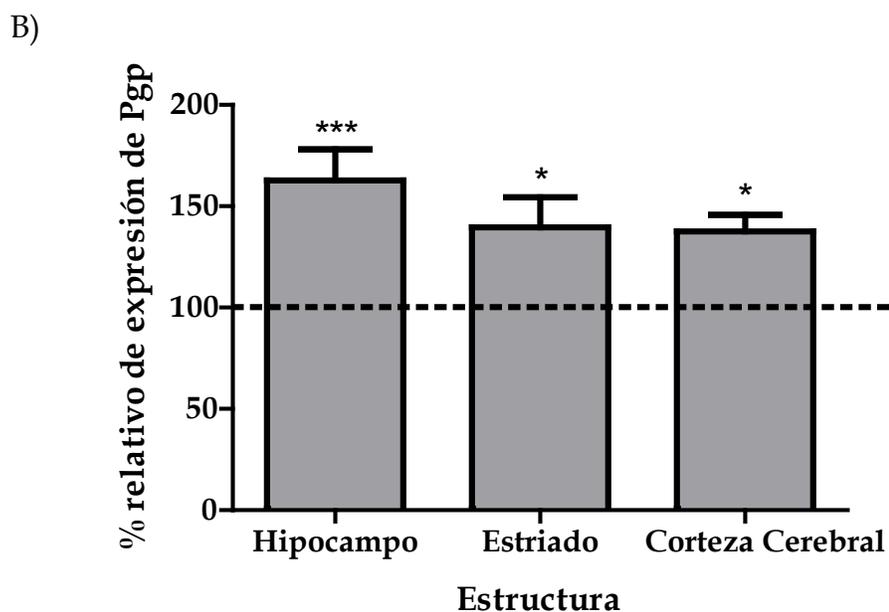
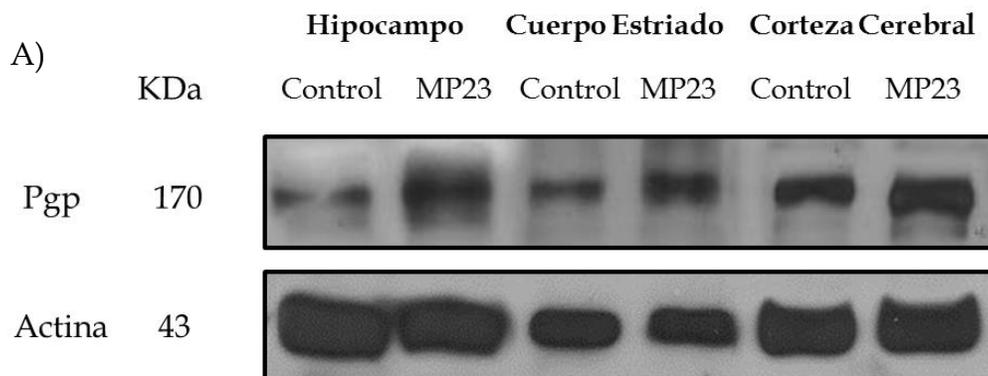


Figura 9: Expresión de Pgp en hipocampo, cuerpo estriado y corteza cerebral de ratones control y MP23 A) Western blot para Pgp (170 KDa) y α -actina (43 KDa). Cada calle representa 30 μ g de proteínas B) El gráfico de barras ilustra el porcentaje relativo de expresión de Pgp respecto al control \pm SEM. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

Los estudios de Western Blot mostraron expresión de Pgp en corteza cerebral, hipocampo y cuerpo estriado de animales control (Fig. 9A), revelando un incremento significativo en la expresión de Pgp en estas mismas áreas en los animales MP23; en corteza cerebral (38%; $p < 0,05$), en hipocampo (63%; $p < 0,01$) y en cuerpo estriado (40%; $p < 0,05$) (Fig. 9A,B).

Expresión de BCRP

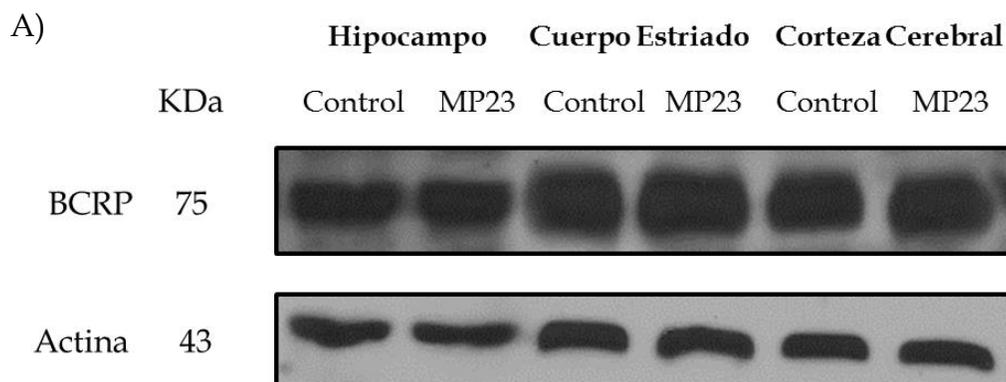


Figura 10A: Expresión de BCRP en hipocampo, cuerpo estriado y corteza cerebral de ratones control y MP23. Western blot para BCRP (75 KDa) y α -actina (43 KDa). Cada calle representa 30 μ g de proteínas.

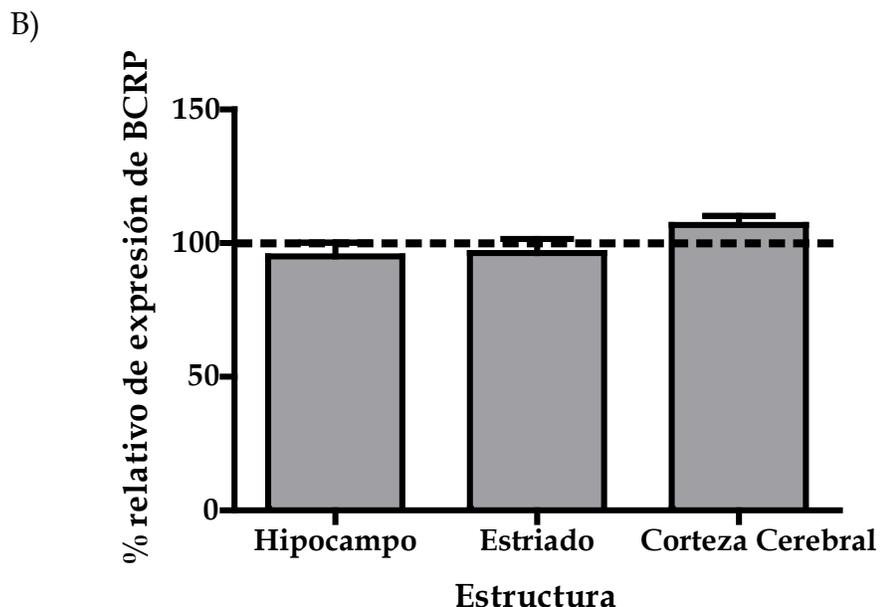


Figura 10B: Expresión de BCRP en hipocampo, cuerpo estriado y corteza cerebral de ratones control y MP23. El gráfico de barras ilustra el porcentaje relativo de expresión de BCRP respecto al control \pm SEM.

Los estudios de Western Blot mostraron una intensa expresión de BCRP en corteza cerebral, hipocampo y cuerpo estriado de animales control y MP23 (Fig. 10A) no habiendo diferencias significativas entre los grupos (Fig 10B).

5 | Relación entre la resistencia a PHT y la sobreexpresión de Pgp

Con el objetivo de buscar una relación entre la resistencia adquirida a PHT y la sobreexpresión de Pgp demostrada anteriormente se utilizaron los siguientes grupos experimentales:

Grupo MP23-PHT (n=6): Los ratones fueron diariamente inyectados con MP durante 23 días. 24 h después de la última inyección, recibieron PHT (18
158

mg/kg, i.p.) y, 2 h más tarde, MP (36 mg/kg, i.p.). Los ratones fueron observados durante 30 min. La severidad y latencia de las convulsiones fueron registradas.

Grupo MP23-PHT + NIMO (n=6): Los ratones fueron diariamente inyectados con MP durante 23 días. 24 h después de la última inyección, recibieron nimodipina (NIMO) (3,5 mg/kg, i.p.), un conocido bloqueante de P_gp, 30 min después fueron administrados con PHT (18 mg/kg, i.p.), y 2 h más tarde con MP (36 mg/kg, i.p.).

Grupo MP23-NIMO (n=6): Los ratones fueron diariamente inyectados con MP durante 23 días. 24 h después de la última inyección, recibieron NIMO (3,5 mg/kg, i.p.), 30 min después fueron administrados con el vehículo de PHT, y 2 h más tarde con MP (36 mg/kg, i.p.).

Grupo MP23-vehículo (n=6): Los ratones fueron diariamente inyectados con MP durante 23 días. 24 h después de la última inyección, recibieron el vehículo correspondiente a NIMO y 30 min después el vehículo correspondiente a PHT. 2 h más tarde fueron administrados con MP (36 mg/kg, i.p.). Este fue un grupo de control de convulsión.

Grupo S23 - PHT (n=6): Los animales recibieron solución salina durante 23 días. En el día 24 fueron administrados con PHT (18 mg/kg, i.p.) y, 2 h después MP (30 mg/kg, i.p.). Como se mencionó anteriormente, la dosis de 30 mg/kg es la dosis que causa crisis generalizada cuando se administra por primera vez.

Grupo S23-NIMO (n=6): Los ratones fueron administrados con solución salina durante 23 días. El día 24 recibieron NIMO (3,5 mg/kg, i.p.), 30 min después vehículo de PHT y 2 h más tarde MP (30 mg/kg, i.p.).

Estos procedimientos son resumidos en el siguiente esquema:

Pre-tratamiento (durante 23 días)	Grupo	Tratamiento		
		0 min	30 min	2 h
Solución salina	S23- PHT	vehículo	PHT 18 mg/kg	MP 30 mg/kg
	S23-NIMO	NIMO 3.5 mg/kg	vehículo	
MP	MP23-PHT	vehículo	PHT 18 mg/kg	MP 36 mg/kg
	MP23-PHT + NIMO	NIMO 3.5 mg/kg	PHT 18 mg/kg	
	MP23-NIMO	NIMO 3.5 mg/kg	vehículo	
	MP23-vehículo	vehículo	vehículo	

Estadística: Los resultados obtenidos de la evaluación del comportamiento convulsivo fueron expresados como la media \pm SEM. Se realizó ANOVA unidireccional seguido de post test de Tukey para comparación de los grupos. Para la comparación de variables categóricas se utilizó test exacto de Fisher.

Resultados:

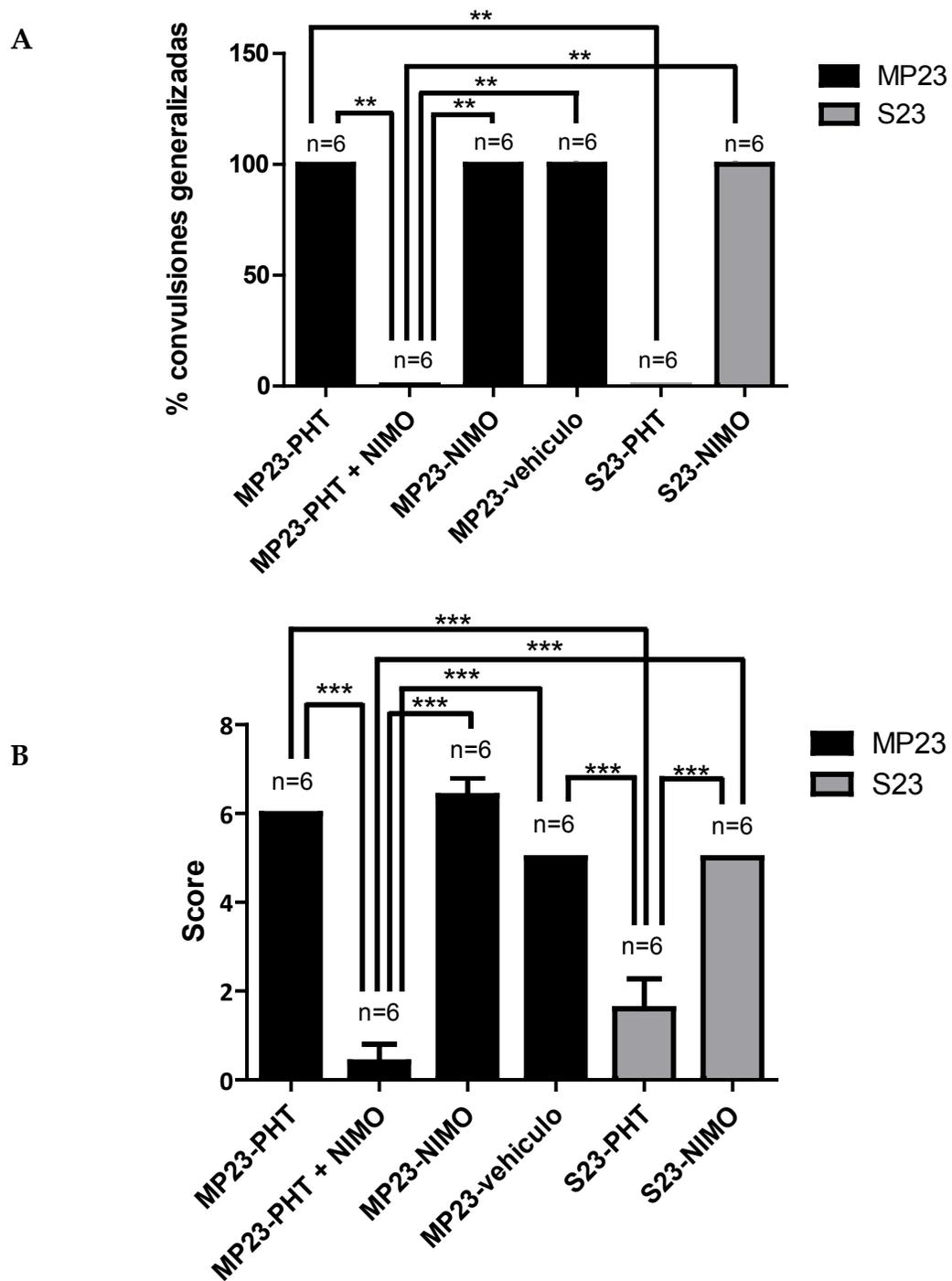


Figura 11: Repetitiva inducción de crisis mediante MP induce resistencia a PHT asociada a sobreexpresión de Pgp. A) Porcentaje de ratones que presentaron convulsiones generalizadas vs. Tratamiento. B) Media del score de las convulsiones \pm S.E.M vs. Tratamiento. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$

- Todos los animales MP23 que fueron administrados solo con MP el día 24 (MP23-vehículo) presentaron convulsiones generalizadas con un *score* de 5, indicando que los ratones MP23 responden positivamente frente a la administración de 36 mg/kg de MP el día 24.
- Ninguno de los animales del grupo S23-PHT presentó crisis generalizada. Estos animales presentaron crisis parciales con un *score* entre 0 y 3 ($1,6 \pm 0,62$; $p < 0,001$ vs. MP23-PHT). Habiendo definido anteriormente como criterio de protección la ausencia de *score* ≥ 4 , PHT presenta actividad anticonvulsivante en el 100% de los animales.
- El 100% de los animales del grupo MP23-PHT mostraron convulsiones generalizadas con un *score* de 6 como consecuencia de la última administración de MP; por lo que PHT no mostró efectos anticonvulsivantes.
- Los animales que recibieron NIMO antes de PHT (MP23-PHT + NIMO), no presentaron convulsiones, ni generalizadas, ni parciales. El 100% de los animales presentaron *score* 0 o 1 ($0,4 \pm 0,36$), mostrando diferencia significativa con el grupo MP23-PHT ($p < 0,01$). Esto indica que la resistencia adquirida a PHT puede ser revertida mediante administración previa de un bloqueante de Pgp.
- El 100% de los ratones del grupo MP23-NIMO (sin PHT) mostró convulsiones generalizadas con un *score* entre 5 y 7 ($6,4 \pm 0,36$), por

lo que NIMO por sí mismo no ejerce efectos anticonvulsivantes en ratones MP23 a la dosis evaluada.

- El grupo S23-NIMO mostró crisis generalizada (*score* 5) para el 100% de los animales demostrando que NIMO tampoco ejerce efectos anticonvulsivantes en animales S23.

6 | Extensión de la farmacoresistencia a otros FAEs

6.1 | Evaluación de la actividad de PB en animales MP23

El PB es un conocido antiepiléptico utilizado en la clínica. Al igual que la PHT este fármaco es reconocido por la Pgp como sustrato (*Zhang et al 2012*). Elegimos el PB por tener un mecanismo de acción diferente de la PHT (modulador de canales GABA_A), teniendo en cuenta la posibilidad de que la resistencia inducida se deba a cambios en el blanco molecular.

Inicialmente se evaluaron diferentes dosis de PB: 5, 10 y 15 mg/kg frente a una única administración de MP 30 mg/kg, i.p.. También se utilizó un grupo tratado con vehículo (CMC 1%) como grupo control.

Resultados:

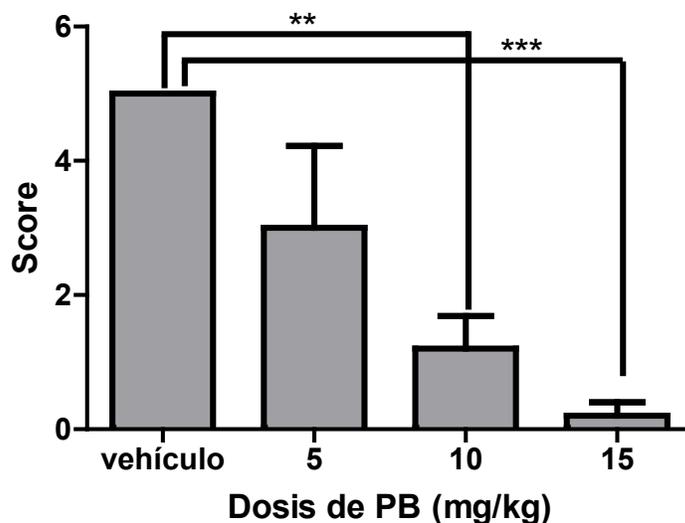


Figura 12: Evaluación del efecto de PB en convulsiones inducidas por MP
p<0,01; * p<0,001.

- PB presentó efectos anticonvulsivantes con una relación lineal dosis-respuesta. Se observó una diferencia en el *score* estadísticamente menor comparado con el grupo control para la dosis de 10 mg/kg ($p < 0,01$) y 15 mg/kg ($p < 0,001$).
- La dosis de 5 mg/kg presentó un *score* promedio de 3 y el mayor *score* presentado fue de 5. Para 10 mg/kg el *score* promedio fue de 1,2 con un *score* de 2 como valor máximo. La dosis de 15 mg/kg obtuvo una media de *score* de 0,2 y el mayor *score* presentado fue de 1. Por lo tanto, la dosis con la que se consiguió el mayor efecto anticonvulsivante fue de 15

mg/kg, tomando como criterio de resistencia la presencia de convulsiones de *score* 2 o mayor.

Para la evaluación de la farmacoresistencia se evaluaron los siguientes grupos experimentales:

Grupo MP23-PB (n=10): Los animales fueron diariamente administrados con MP durante 23 días. El día 24 los animales fueron tratados con PB (15 mg/kg; i.p.) y, 1h más tarde, se administró MP (36 mg/kg; i.p.)

Grupo MP23-PB + NIMO: Los ratones fueron diariamente inyectados con MP durante 23 días. 24 h después de la última inyección, recibieron NIMO 3,5 mg/kg i.p., 30 min después fueron administrados con PB (15 mg/kg; i.p.) y 1 h más tarde se administró MP (36 mg/kg, i.p.).

Grupo MP23-vehículo: Los animales fueron administrados con MP durante 23 días. El día 24 recibieron el vehículo correspondiente a la solución de PB y, 1 h más tarde MP (36 mg/kg, i.p.).

Grupos S23-PB (n=10): Los animales recibieron solución salina durante 23 días. El día 24 se administró PB (15 mg/kg; i.p.) y, 1 h más tarde MP (30 mg/kg, i.p.).

Grupo S23-vehículo (n=6): Los animales recibieron solución salina durante 23 días. El día 24 se administró el vehículo de PB y, 1 h más tarde MP (30 mg/kg, i.p.).

La siguiente figura esquematiza los tratamientos descriptos:

Pre-tratamiento (durante 23 días)	Grupo	Tratamiento		
		0 min	15 min	1 h
Saline	S23- CBZ	CBZ 25 mg/kg	MP30 mg/kg	-
	S23-DZP	DZP 0.5 mg/kg	-	MP 30 mg/kg
	S23-LEV	LEV 33 mg/kg	-	
	S23-salina	salina	-	
MP	MP23-CBZ	CBZ 25 mg/kg	MP 36 mg/kg	-
	MP23-DZP	DZP 0.5mg/kg	-	MP 36 mg/kg
	MP23-LEV	LEV 33 mg/kg	-	
	MP23-salina	salina	-	

Estadística: Los resultados obtenidos de la evaluación del comportamiento convulsivo fueron expresados como la media \pm SEM. Se realizó ANOVA unidireccional seguido de post test de Tukey para comparación de los grupos. Para la comparación de variables categóricas se utilizó el test exacto de Fisher.

Resultados:

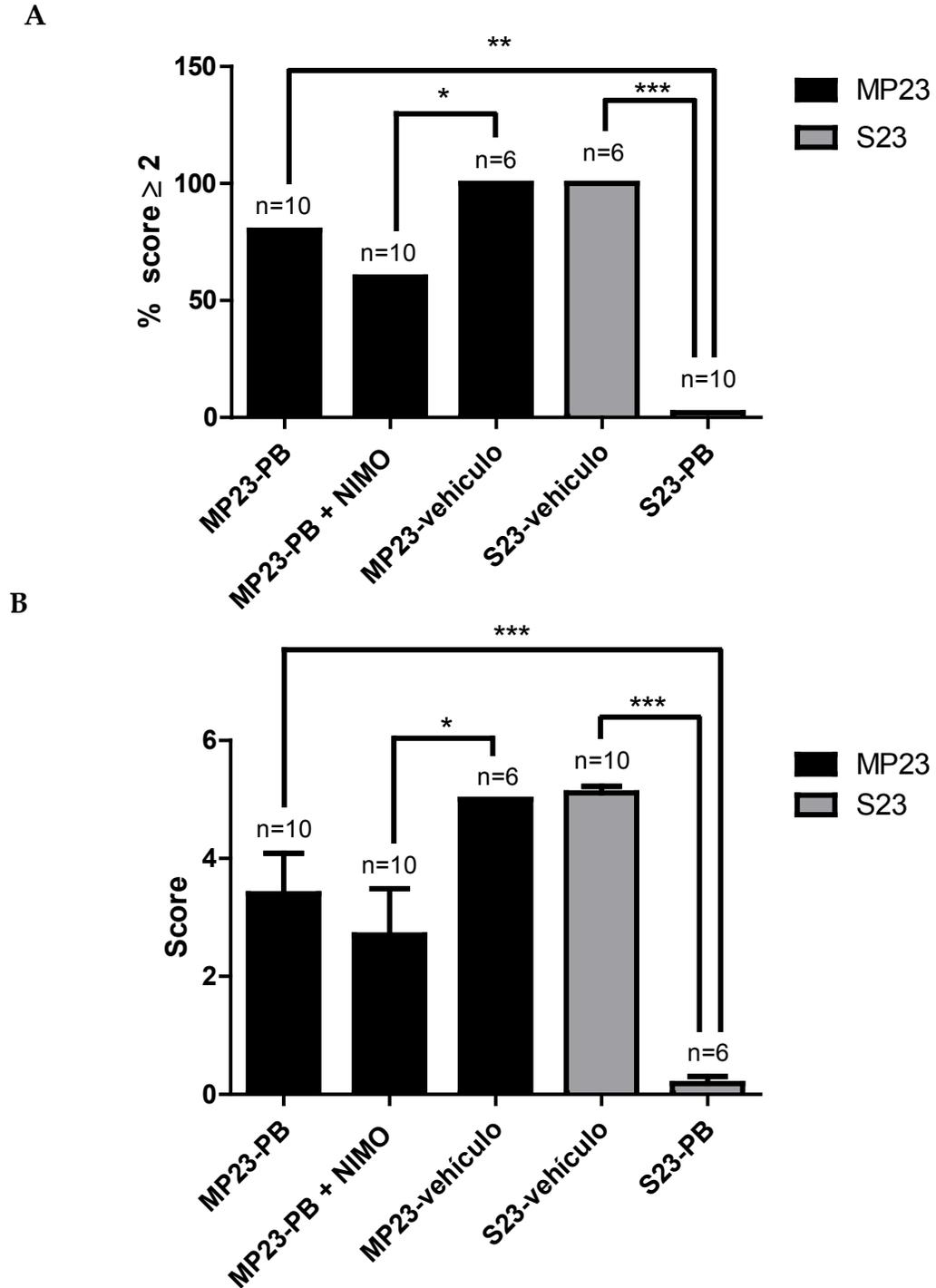


Figura 13: La inducción reiterada de crisis mediante MP induce resistencia a PB. A) Media de *score* convulsivo \pm SEM vs tratamiento. B) Porcentaje de ratones que mostraron un *score* convulsivo mayor o igual a 2 para cada grupo.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

- El grupo S23-PB mostró efecto anticonvulsivante en el 100% de los ratones ($p < 0,001$ vs S23-vehículo) con un *score* de 0 o 1 ($0,18 \pm 0,12$; $p < 0,001$ vs S23-salina). *Score* 1 incluyó *nooding*, parpadeo e inmovilidad. Teniendo en cuenta estos resultados, el criterio de resistencia fue la presencia de *score* convulsivo ≥ 2 .
- El 80% de los ratones del grupo MP23-PB mostró un *score* ≥ 2 ($p < 0,01$ vs S23-PB) con una media de $3,4 \pm 0,68$ ($p < 0,001$ vs S23-PB), siendo resistentes a los efectos anticonvulsivantes de PB.
- La administración de NIMO antes de PB redujo el porcentaje de animales resistentes un 20% respecto al grupo MP23-PB. Esta diferencia no resulta estadísticamente significativamente, sin embargo, estos animales presentaron un *score* de $2,7 \pm 0,78$, siendo el 60% ≥ 2 , ambos parámetros significativamente menores respecto del grupo MP23-vehículo ($p < 0,05$). Por lo tanto, en los animales del grupo MP23-PB + NIMO se observa efecto anticonvulsivante.

6.2| Evaluación de la actividad de FAEs no sustratos de Pgp en animales MP23.

Se utilizaron 3 FAEs no sustratos de Pgp con distintos mecanismos de acción: CBZ; bloqueantes de canales de sodio voltaje dependientes, DZP; modulador alostérico de canales GABA_A y LEV; modulación de la neurotransmisión mediante unión a vesículas SV2A. El objetivo de este

experimento fue confirmar la relación entre la resistencia adquirida y la sobreexpresión de Pgp.

Se evaluaron los siguientes grupos experimentales (cada FAE fue evaluado a su Tiempo de Efecto Máximo):

Grupo MP23-CBZ (n=9): Los animales fueron diariamente administrados con MP durante 23 días. El día 24 los animales fueron tratados con CBZ (25mg/kg, i.p.) y, 15 min más tarde, MP (36 mg/kg; i.p.).

Grupo MP23-DZP (n=6): Los ratones fueron diariamente administrados con MP durante 23 días. El día 24 recibieron DZP (0,5 mg/kg, i.p.) y, 1h más tarde, MP (36 mg/kg, i.p.)

Grupo MP23-LEV (n=5): Los animales fueron administrados con MP durante 23 días. El día 24 recibieron LEV 33 mg/kg y, 1h después MP36 Mg/kg i.p.

Grupo MP23-Salina (n=9): Los animales fueron inyectados con MP durante 23 días. 24 h después de la última administración de MP se les administró solución salina y MP 36 mg/kg i.p.

Grupos S23-CBZ, S23-DZP, S23-LEV y S23-Salina (n=6): Los animales fueron manipulados como se describió para cada grupo MP23 respectivo, excepto que recibieron solución salina durante 23 días en lugar de MP como pretratamiento. El día 24 se administró MP 30 mg/kg en lugar de 36 mg/kg. (30

mg/kg es la dosis que induce convulsiones generalizadas cuando MP es administrado por primera vez).

La siguiente figura esquematiza los tratamientos descriptos:

Pre-tratamiento (durante 23 días)	Grupo	Tratamiento		
		0 min	15 min	1 h
Solución Salina	S23- CBZ	CBZ 25 mg/kg	MP30 mg/kg	-
	S23-DZP	DZP 0.5 mg/kg	-	MP 30 mg/Kg
	S23-LEV	LEV 33 mg/kg	-	
	S23-salina	salina	-	
MP	MP23-CBZ	CBZ 25 mg/kg	MP 36 mg/kg	
	MP23-DZP	DZP 0.5mg/kg	-	MP 36 mg/kg
	MP23-LEV	LEV 33 mg/kg	-	
	MP23-salina	salina	-	

Estadística: Los resultados obtenidos de la evaluación del comportamiento convulsivo fueron expresados como la media \pm SEM. Se realizó ANOVA unidireccional seguido de post test de Tukey para comparación de los grupos.

Resultados:

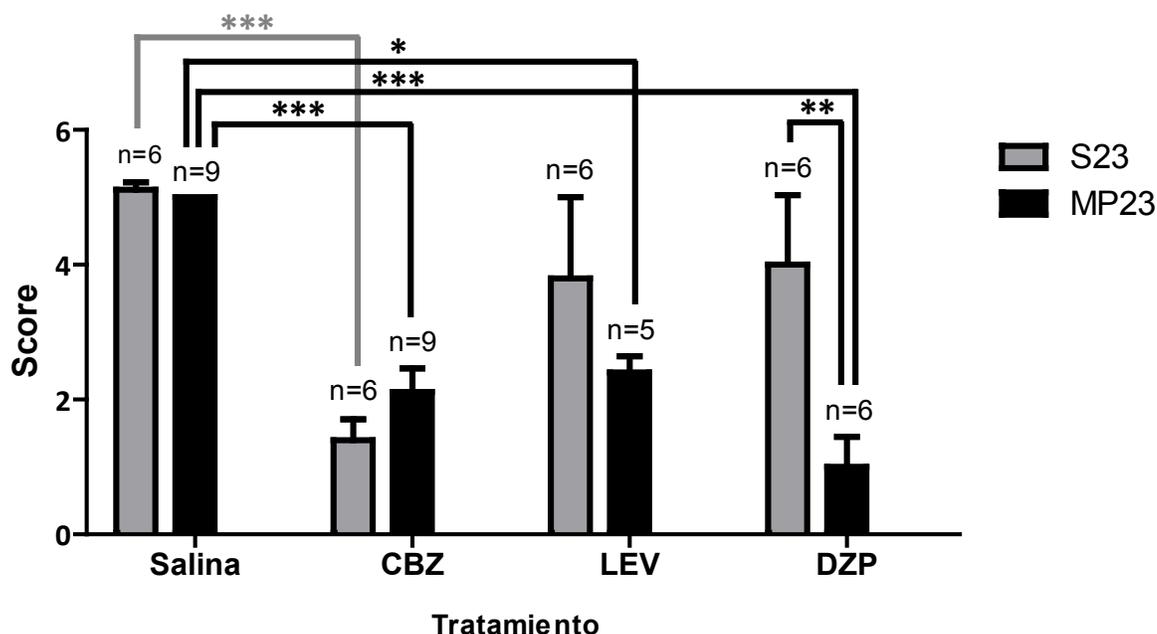


Figura 14: Evaluación de agentes anticonvulsivantes no sustratos de Pgp en ratones MP23 y S23. Se graficó la media del *score* convulsivo \pm SEM en función del tratamiento con los distintos FAEs. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

- Todos los ratones MP23 y S23 administrados con salina en el día 24 mostraron crisis generalizadas (*score* 5 ± 0 y $5,11 \pm 0,11$ respectivamente) después de la administración de MP.
- La administración de CBZ en animales S23 (grupo S23-CBZ) ejerció protección frente a convulsiones generalizadas a la dosis evaluada mostrando una media de *score* convulsivo significativamente menor respecto de S23-salina (*score* $0-2$; $1,4 \pm 0,3$) ($p < 0,001$). En la misma línea, el grupo MP23-CBZ disminuyó la media del *score* ($2,11 \pm 0,35$) respecto del grupo MP23-Salina ($p < 0,001$). Estos resultados indican que CBZ puede

inducir efectos anticonvulsivantes incluso en animales con sobreexpresión de Pgp.

- LEV y DZP no mostraron efectos anticonvulsivantes en animales S23 a las dosis evaluadas. Sin embargo, a esas mismas dosis, se observó una disminución significativa del *score* convulsivo para los grupos MP23-LEV (*score* $2,4 \pm 0,2$; $p < 0,05$ respecto a MP23-Salina) y MP23-DZP (*score* $1 \pm 0,44$; $p < 0.001$ respecto a MP23-Salina). Por lo tanto, los animales MP23 tratados con LEV y DZP mostraron actividad anticonvulsivante a una dosis que no resulta activa en animales S23.
- Los FAEs no sustrato de Pgp evaluados no mostraron resistencia en animales con sobreexpresión de Pgp.

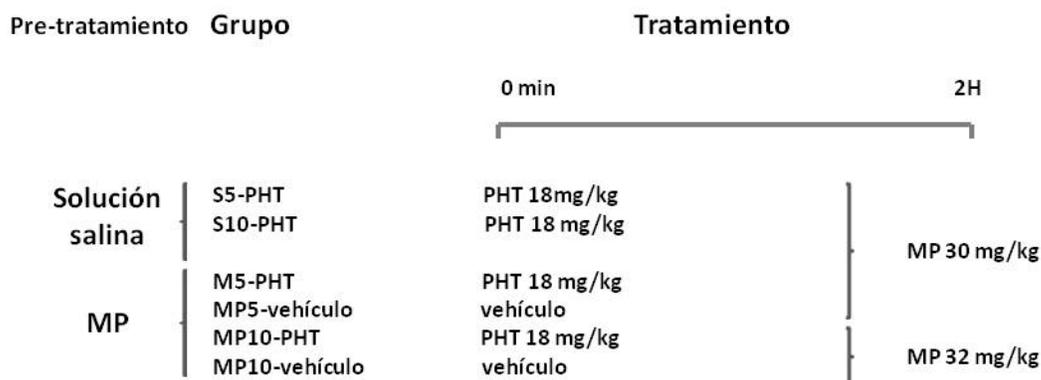
Tratamientos alternativos

En el trascurso del desarrollo de este modelo, también fueron evaluados tratamientos alternativos:

Administración de MP 2 veces al día:

Con el objetivo de disminuir el tiempo de tratamiento se evaluó el efecto de 10 y 20 administraciones de MP en un período de 5 y 10 días respectivamente. La administración de MP se realizó dos veces al día con un intervalo de 10 hs entre ambas administraciones. La dosis de MP fue de 30 mg/kg desde la administración número 1 hasta la 9, y de 32 mg/kg desde la 10 hasta la 20 debido a una disminución del *score* convulsivo.

24 horas después de la última administración de MP o salina, según pre-tratamiento, se evaluó la respuesta frente a PHT 18 mg/kg (n=5 para todos los grupos) según el siguiente esquema:



Resultados:

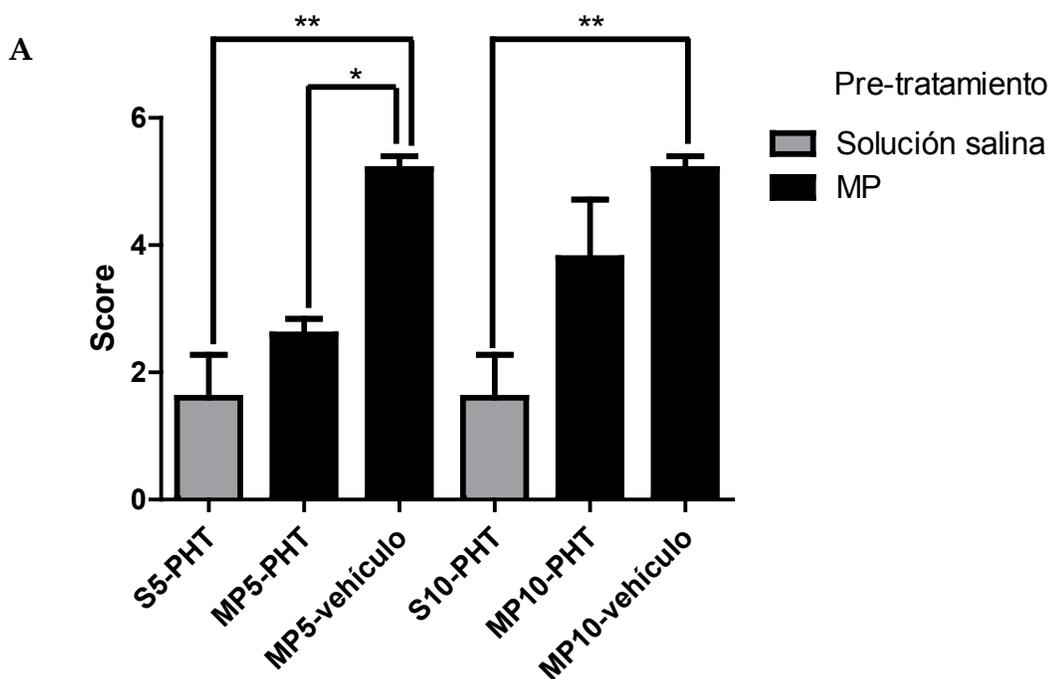


Figura 15A: Evaluación del efecto de PHT en animales tratados con MP durante 5 o 10 días, 2 veces al día. Score convulsivo representado como la media \pm SEM.

B

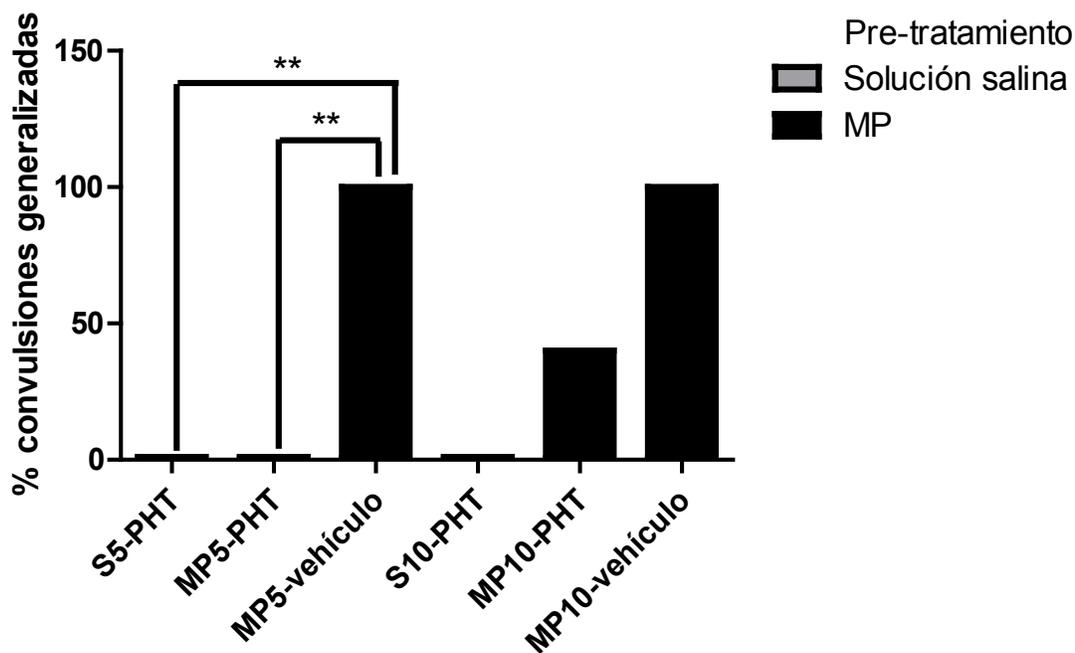


Figura 15 B: Evaluación del efecto de PHT en animales tratados con MP durante 5 o 10 días, 2 veces al día. Porcentaje de animales que presentaron convulsiones generalizadas para cada tratamiento.

- Los animales del grupo MP5-PHT no presentaron crisis generalizada, todos tuvieron convulsiones con un *score* de 2 ó 3, siendo significativa la diferencia con el grupo sin PHT (MP5-vehículo) ($p < 0,05$).
- Ninguno de los animales del grupo MP5-PHT presentó resistencia a PHT ya que ninguno de ellos presentó convulsiones generalizadas ($p < 0,01$ en comparación con MP5-vehículo).
- MP10-PHT presentó un aumento del *score* convulsivo respecto del grupo S23-PHT que no fue estadísticamente significativo. La media de

score de este grupo tampoco fue significativa respecto del grupo MP10-vehículo.

- Un 40% de los animales del grupo MP10-PHT mostraron crisis generalizada, siendo resistentes a los efectos anticonvulsivantes de la PHT. Este porcentaje no es estadísticamente diferente respecto del grupo sin tratamiento anticonvulsivante (MP10-vehículo).

Evaluación de los animales MP23 en prueba MES:

El objetivo de este experimento fue evaluar la resistencia al efecto anticonvulsivante de PHT frente a las convulsiones tónico clónicas inducidas en la prueba MES luego del tratamiento MP23. El interés que presenta este experimento radica en la necesidad de evaluar nuevos fármacos que solo resultan activos frente a MES y, por lo tanto, no pueden ser evaluados frente a las crisis inducidas por MP. Si bien este no es el caso de PHT, este fármaco permite la evaluación en el modelo MES, por lo que resulta útil para tal fin.

Tal como se describió anteriormente, se administró MP durante 23 días a 4 ratones (MP23). El día 24, fueron administrados con PHT a la dosis que presenta el máximo efecto frente a MES test (13 mg/kg, i.p.) y 2 h después se aplicó el estímulo MES mediante electrodo de ojos. El ensayo MES, descrito detalladamente en el capítulo III, consistió en la aplicación, mediante un generador de pulsos Ugo Basile, de un estímulo con los siguientes parámetros:

Parámetro	Valor
Corriente	50 mA
Frecuencia de pulso	60 Hz
Ancho de pulso	0,6 ms
Duración de pulso	0,2 ms

Los animales sin tratamiento que reciben este estímulo presentan convulsiones tónico-clónicas en el 100% de los casos. Se consideraron protegidos aquellos animales que no presentaron crisis tónico-clónica, de acuerdo al criterio de protección del ensayo MES.

También fue evaluado un grupo control (n=4): Los animales fueron administrados con solución salina durante 23 días (S23). En el día 24 se administró PHT 13 mg/kg, y 2 h después, se aplicó el estímulo MES.

Resultados:

Todos los animales de ambos grupos (S23 y MP23) fueron protegidos de la crisis tónico-clónica. Es decir que los animales MP23 no presentan resistencia a PHT cuando son evaluados en el modelo MES, manteniendo una protección del 100% de los animales. Otros autores han obtenido el mismo resultado para la resistencia inducida mediante el modelo de Pilocarpina. Ellos postularon que el hecho de que diferentes estructuras cerebrales estén involucradas en los diferentes

tipos de convulsiones puede ser la causa de la diferencia en la respuesta según el modelo. En el capítulo VI se ampliará la discusión de estos resultados.

Evaluación de los animales MP23 en prueba s.c.PTZ:

El objetivo de este experimento fue evaluar la sensibilidad de los ratones MP23 frente a las crisis inducidas mediante administración subcutánea de PTZ. El antecedente de haber sufrido convulsiones repetidas podría inducir una mayor sensibilidad a los estímulos convulsivos. Si bien los animales no mostraron efecto *kindling* durante el tratamiento con MP, esto podría atribuirse a una disminución de los niveles cerebrales de MP por sobreexpresión de Pgp. El tiempo de latencia de las distintas fases de la convulsión inducida por PTZ es una medida del umbral convulsivo de los animales (*Mandhane et al 2007*).

Como se describió en el capítulo III, algunos modelos de epilepsia reportan un comportamiento convulsivo espontáneo luego de un mes del estímulo inicial (*Brandt et al 2004; Curia et al 2008; Williams et al 2009*). Por este motivo nosotros evaluamos la respuesta a PTZ 6 semanas después de la última administración de MP.

12 animales MP23 fueron administrados con Pentilentetrazol (PTZ) (80 mg/kg; s.c.). Inmediatamente después de la inyección fueron colocados en cajas individuales y observados durante 30 min. Se registró la presencia y latencia de las

fases de mioclonías, convulsión clónica y convulsión tónica. Un grupo de 12 animales control (S23) fue manipulado de la misma manera.

Resultados:

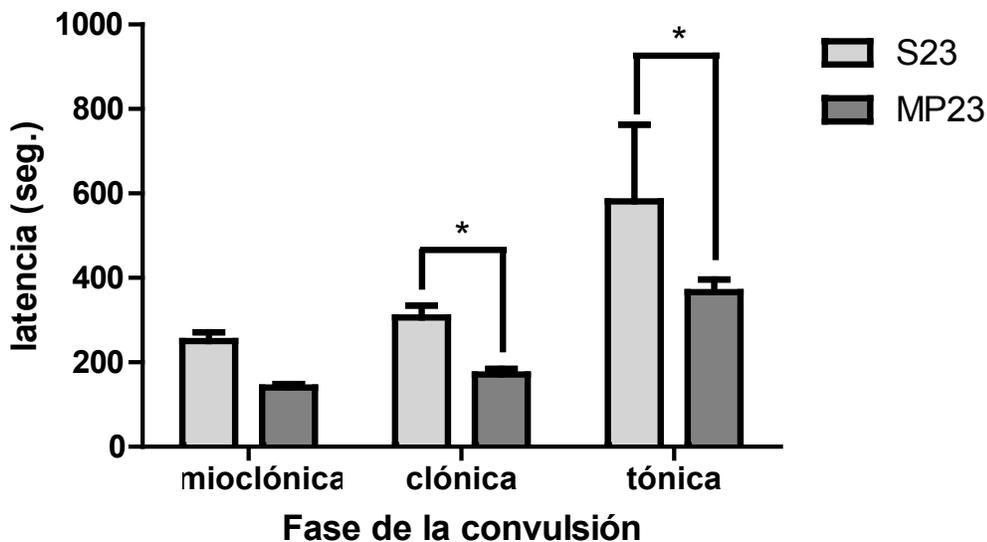


Figura 16: Tiempo de latencia para las fases mioclónica, clónica y tónica de las convulsiones inducidas por s.c.PTZ 80 mg/kg. * $p < 0,05$.

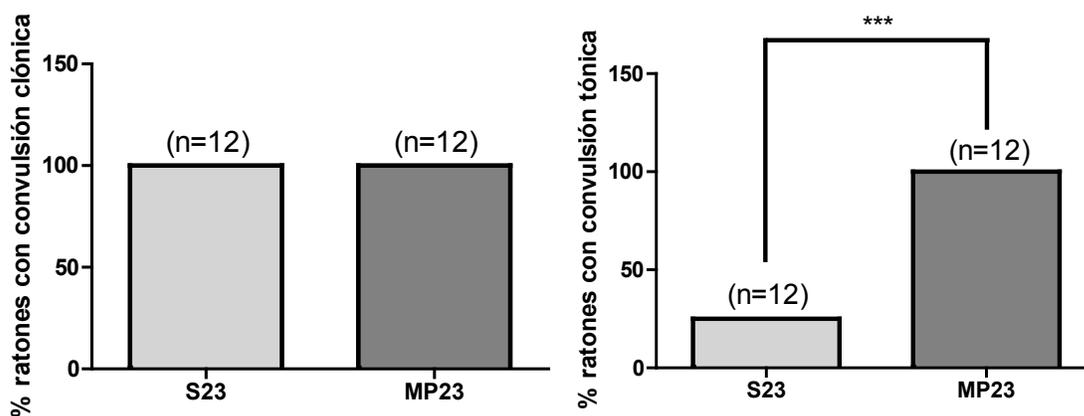


Figura 17: Porcentaje de animales que presentaron convulsiones clónicas y tónicas respectivamente. *** $p < 0,001$.

- Todos los animales MP23 y S23 presentaron convulsiones clónicas.
- El 100% (12/12) de los animales MP23 presentaron fase tónica mientras que solo el 25% de los S23 (3/12) presentaron esta fase.
- Se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en los tiempos de latencia de las fases clónica y tónica, mostrando una mayor susceptibilidad a las convulsiones para el grupo MP23.

Hemos desarrollado un nuevo modelo en ratones, en el que se inducen convulsiones recurrentes durante 23 días mediante la administración del agente convulsivante ácido 3-mercaptopropionico. En el transcurso del tratamiento los animales presentan convulsiones generalizadas sin efecto *kindling*. Luego del tratamiento, las convulsiones inducidas por MP muestran resistencia al efecto anticonvulsivante de fenitoína y fenobarbital (ambos sustratos de Pgp), la cual es revertida con la administración de un bloqueante de Pgp (nimodipina) y son sensibles a los efectos de carbamazepina, diazepam y levetiracetam (no sustratos de Pgp). Los estudios histológicos demostraron una expresión aumentada de Pgp pero no de BCRP en corteza cerebral, hipocampo y cuerpo estriado.

A partir de los resultados podemos concluir que MP23 es un modelo de convulsiones con farmacoresistencia mediada por sobreexpresión de Pgp.

En el capítulo VI se realiza la discusión de los resultados obtenidos.

Referencias:

Brandt C, Volk HA, Löscher W. (2004) Striking Differences in Individual Anticonvulsant Response to Phenobarbital in Rats with Spontaneous Seizures after Status Epilepticus. *Epilepsia*, 45 (12):1488-1497.

Curia G, Longo D, Biagini G, et al. (2008) The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience Methods*, 172:143-157.

Mandhane SN, Aavula K, Rajamannar T. (2007) Timed pentylenetetrazol infusion test: A comparative analysis with s.c.PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice. *Seizure*, 16: 636-644.

Racine RJ. (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 32(3):281-294.

Ramsay RE, DeToledo J. (1997) Tonic-clonic seizures: a systematic review of antiepilepsy drug efficacy and safety. *Clin Ther*, 19(3):433-46; discussion 367-8.

Rodriguez de Lores Arnaiz G, Alberici de Canal M, Robiolo B, et al. (1973) The effect of the convulsant 3-mercaptopropionic acid on enzymes of the aminobutyrate system in the rat cerebral cortex. *J. Neurochem*, 21:615-623.

Skilbeck K, Jhonston G, Hinton T. (2010) Stress and GABA_A receptors. *Journal of Neurochemistry*, 112:1115-1130.

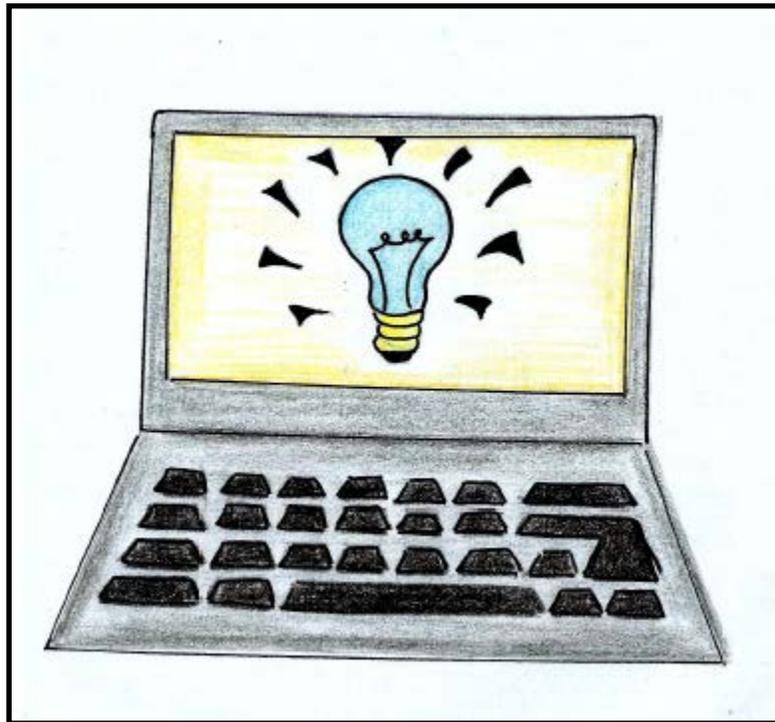
Stepien K., Tomaszewski M., Tomaszewska J, et al. (2012) The multidrug transporter P-glycoprotein in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *Pharmacological Reports*, 64:1011-1019.

Williams PA, White AM, Clark S, et al. (2009). Development of spontaneous recurrent seizures after kainite induced status epilepticus. *Neurosci*, 29(7):2103-2112.

Zhang C, Kwan P, Zuo Z, et al. (2012) The transport of antiepileptic drugs by P-glycoprotein. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64:930-942.

CAPÍTULO V

Metodología y resultados II:



**Inhibidores de COX-2 como
tratamiento adicional a la terapia
antiepiléptica.**

Capítulo V

Metodología y resultados II:

Inhibidores de COX-2 como tratamiento adicional a la terapia antiepiléptica.

La epilepsia es a menudo acompañada de inflamación del tejido cerebral. Así mismo, reacciones inflamatorias con el consecuente incremento en la expresión de mediadores de la inflamación interleukina I β , factor de necrosis tumoral alfa, ciclooxigenasa-2 (COX-2) y quimioquina 10 tipo CXC (CXCL10) después de una convulsión o lesión, pueden causar un daño secundario en el cerebro e incrementar la probabilidad de convulsiones repetitivas. Particularmente, la enzima COX-2 se induce rápidamente durante las convulsiones. El aumento del nivel de la COX-2 en áreas específicas del cerebro epiléptico puede ayudar a identificar las regiones en donde ocurre inflamación cerebral luego de una convulsión (*Rojas et al 2014*).

Se ha comprobado que la COX-2 juega un papel crucial en la cascada de señalización que culmina en la sobreexpresión de proteínas de eflujo como consecuencia de las crisis convulsivas, la cual resulta bloqueada por inhibidores selectivos de COX-2 (*Bauer et al 2008; Zibell et al 2009*). Además, se ha reportado que la alteración de la barrera hemato-encefálica como consecuencia de la

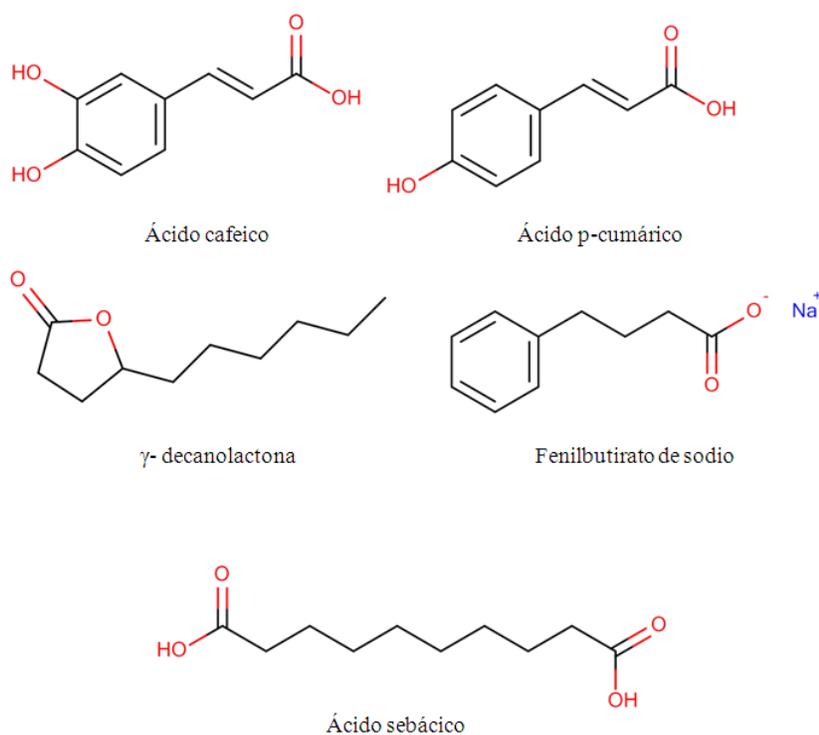
inducción neuronal de COX-2 puede promover el proceso de epileptogenesis (*Serrano et al 2011; Jiang et al 2013*).

Por estas razones se cree que la co-administración de inhibidores de COX-2 junto al tratamiento antiepiléptico podría ser útil en la prevención, tanto del proceso epileptogénico como de la adquisición de farmacorresistencia como resultado del mismo. La búsqueda de fármacos anticonvulsivantes que cumplan además con la función de inhibir COX-2 resulta interesante para el tratamiento temprano de las epilepsias, evitando la polifarmacia para los pacientes y, por lo tanto, favoreciendo la adherencia al tratamiento.

El Laboratorio de Investigación de Desarrollo de Bioactivos ha generado funciones matemáticas basadas en descriptores moleculares 2D capaces de categorizar como inhibidores de la enzima COX-2, compuestos orgánicos almacenados en grandes bases de datos. Una combinación de 10 modelos fue aplicada sobre una base de datos unificada y curada que contiene a la base DrugBank 4.0 y a la base SWEETLEAD. Una vez separados los candidatos a inhibidores de la enzima COX-2, fue aplicado un segundo filtro para predecir actividad anti-MES (*Talevi et al 2007*).

De un total de 10840 compuestos, 152 fueron seleccionados como activos en el modelo MES e inhibidores de COX-2 simultáneamente. Los siguientes 5

compuestos fueron adquiridos comercialmente y evaluados farmacológicamente. La selección se realizó según los siguientes criterios: alta solubilidad en agua, acción anticonvulsivante o depresora del sistema nervioso central conocida, baja toxicidad, disponibilidad en el mercado y bajo costo.



1 | Evaluación de la actividad anticonvulsivante en los modelos MES y PTZ.

Se utilizaron ratones NIH: Swiss entre 18 y 23 g, adquiridos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP. Los animales fueron mantenidos en un bioterio de tránsito. Antes de las evaluaciones se les administró 0,1 ml de solución salina cada día durante una semana de manera de disminuir el estrés inducido por la manipulación (*Skilbeck et al 2010*).

Ácido p-cumárico, ácido cafeico y fenilbutirato de sodio fueron adquiridos en Sigma, mientras que ácido sebáico y γ -decanolactona fueron provistas por Aldrich. Como vehículo se utilizó solución fisiológica para las soluciones de ác. sebáico (a pH=10) y fenilbutirato de sodio; carboximetilcelulosa 1% (CMC) para las soluciones de γ -decanolactona y ác. cafeico; y polietilenglicol 400 (PEG) al 60% para soluciones de ác. cumárico. Todas las soluciones se administraron a razón de 10 ml/kg excepto el ác. cumárico que se administró en un volumen de 5 ml/kg debido a la toxicidad del vehículo. La vía de administración fue i.p.

Los compuestos seleccionados fueron evaluados según la fase I del programa ADD (*White et al 2006*), en los modelos MES, PTZ y Rotorod, excepto γ -decanolactona por haber sido reportada su actividad en ambos modelos con anterioridad (*Coelho de Souza et al 1997*).

Ensayo MES

El ensayo MES, descrito detalladamente en el capítulo III, consistió en la aplicación de un estímulo eléctrico mediante electrodos auriculares utilizando un generador de pulsos Ugo Basile. El estímulo entregado consta de los siguientes parámetros:

Parámetro	Valor
Corriente	50 mA
Frecuencia de pulso	60 Hz
Ancho de pulso	0,6 ms
Duración de pulso	0,2 ms

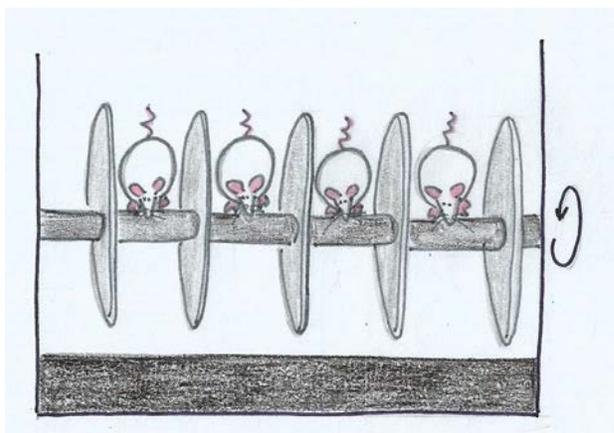
Se usó como criterio de protección la ausencia de la fase de extensión tónica de los miembros posteriores.

Ensayo PTZ

El modelo PTZ, también descrito detalladamente en el capítulo III, consistió en la administración subcutánea (SC) de una solución de pentilenetetrazol (PTZ) a 70 mg/kg, preparada al momento de la evaluación en solución salina, a razón de 5 ml/kg. Esta dosis de PTZ fue determinada en nuestro laboratorio como la dosis que provoca crisis clónica generalizada en el 97% de los animales. Los animales fueron observados durante los 30 min siguientes a la inyección de PTZ. Se tomó como criterio de protección la ausencia de crisis clónica, parcial o generalizada.

Modelo Rotorod

También se evaluó la neurotoxicidad de los animales administrados con los compuestos evaluados utilizando el modelo **Rotorod**.



El equipo de **Rotorod** consiste en un cilindro estriado, dividido por discos opacos, que gira a una velocidad de 6 rpm. Los animales son dispuestos sobre el cilindro, en cada compartimento, y se evalúa la

capacidad de mantener el equilibrio sobre este cilindro giratorio durante 1 min en 3 pruebas consecutivas.

Los animales son evaluados en este test antes de ser sometidos al ensayo de convulsión aguda (MES o PTZ). La imposibilidad de los animales de mantener el equilibrio durante las 3 pruebas, manifestando ataxia y sedación, se considera un signo de neurotoxicidad. (*Jones & Roberts 1968; Jaenisch et al 2016*)

Los animales fueron administrados con los compuestos seleccionados a 30 y 100 mg/kg y evaluados en los tres modelos descritos, luego de 30 min y 4 horas desde el momento de la administración de manera de obtener un perfil de actividad (Fase I del programa ADD-NIH). Se utilizaron, en principio 2 animales por dosis/tiempo. Aquellos que mostraron actividad se repitieron en otro día de experimentación y con un lote de animales diferente de manera de aumentar la robustez de los ensayos mediante la variación de condiciones que podrían modificar los resultados.

Resultados:

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos para el grupo de fármacos evaluados:

Fármaco	Dosis (mg/kg)	MES		sc PTZ		Rotorod	
		30 min	4 h	30 min	4 h	30 min	4 h
Ác. Cafeico	30	1/4	0/2	0/2	0/2	0/6	0/4
	100	2/6	1/4	0/2	0/2	0/8	0/6
Ác. Cumárico	30	0/2	0/2	nt	0/2	1/2	0/4
	100	1/4	2/5	nt	0/2	1/4	0/7
Ác. Sebácico	30	0/2	0/2	1/4	0/2	0/6	0/4
	100	0/2	1/4	3/4	1/4	0/6	0/8
Fenilbutirato de sodio	30	2/4	0/2	2/4	0/2	0/8	0/4
	100	2/6	0/2	0/2	1/4	0/8	0/6

Tabla 1: Fracción de protección frente a las convulsiones inducidas en modelos MES y PTZ y efecto neurotóxico evaluado mediante Rotorod. nt: no testeado.

- Todos los compuestos evaluados presentaron actividad anticonvulsivante en el modelo MES a dosis ≤ 100 mg/kg.
- Ác. cafeico, ác. sebácico y fenilbutirato de sodio no mostraron efectos neurotóxicos a las dosis evaluadas, por lo que pertenecen a la categoría I según el programa ADD, para el modelo MES.
- Ac. cumárico presentó efectos neurotóxicos a 30 mg/kg, por lo que fue clasificado como categoría 4 según el programa ADD, para el modelo MES.

- Respecto al modelo PTZ, ácido sebácico y fenilbutirato de sodio mostraron actividad en este modelo a dosis de 30 mg/kg, siendo clasificados como categoría I para este modelo.
- Ác. cafeico y ácido cumárico no mostraron efectos anticonvulsivantes frente a las crisis inducidas por PTZ a las dosis evaluadas.

2| Evaluación de la actividad anticonvulsivante frente a la administración aguda de MP.

Los compuestos que resultaron ser activos en ambos modelos fueron evaluados frente a la administración de una única dosis de MP, de manera de evaluar la capacidad de inhibir la severidad de las crisis inducidas por dicho agente convulsivante. Se utilizaron los compuestos activos en ambos modelos debido a que prometen tener un espectro más amplio en cuanto a los tipos de epilepsia en los que podrían ser efectivos. También se evaluó la actividad de un conocido inhibidor selectivo de COX-2 (Celecoxib) con antecedentes en la acción anticonvulsivante sobre convulsiones clónicas generalizadas inducidas por PTZ (*Zandieh et al 2010*) y una baja actividad sobre convulsiones tónico-clónicas inducidas en el modelo MES test (*Tayal et al 2008*). Además, se ha estudiado su rol en la prevención de la sobreexpresión de Pgp endotelial inducida por las convulsiones en un modelo de epilepsia subsiguiente al estatus epiléptico (*Zibell et*

190

al 2009) y la consecuente reversión del fenotipo farmacorresistente (*Schlichtiger et al 2010*).

Se utilizaron ratones NIH: Swiss de entre 25 y 30 g de peso. Las condiciones experimentales fueron las mismas que para los modelos MES y PTZ.

Luego de la semana de adaptación, 8 ratones por grupo fueron administrados con ácido sebáico (100 mg/kg), fenilbutirato de sodio (30 mg/kg), γ -decanolactona (400 mg/kg) o celecoxib (10 mg/kg; un conocido bloqueante selectivo de COX-2). Los dos primeros fueron disueltos en solución fisiológica mientras que en los dos últimos casos se utilizó CMC 1% como vehículo, con un volumen de 10 ml/kg. Todos los fármacos fueron administrados por vía i.p.

30 min después de la administración de los fármacos se inyectó MP 30 mg/kg y se observó el comportamiento de los animales durante 30 min registrando la severidad de las crisis presentadas. Un grupo control (n=8) fue administrado con CMC 1% y, 30 min después, con MP 30 mg/kg.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, seguido de test de Dunnett para comparar cada uno de los grupos con el grupo control. GraphPad Prism 5.0 fue utilizado para la realización de los gráficos y análisis estadísticos.

Resultados:

Los resultados de la severidad de las crisis inducidas, según la escala de Racine modificada, se muestran en la figura 1.

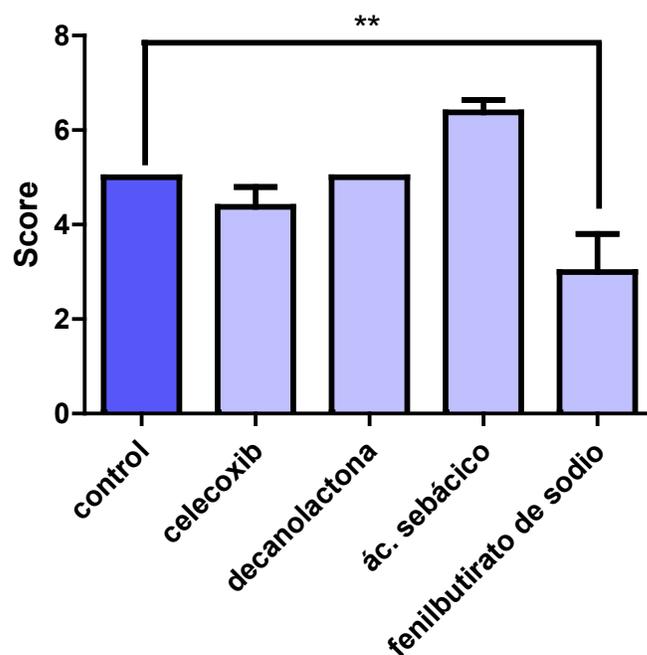


Figura 1: Media del score convulsivo \pm SEM para los distintos tratamientos.
** $p < 0,01$.

- Fenilbutirato de sodio fue el único compuesto que mostró actividad anticonvulsivante a las dosis y tiempos evaluados, disminuyendo significativamente el score convulsivo ($3 \pm 0,8$) respecto del grupo sin tratamiento (5 ± 0) ($p < 0,01$).
- Celecoxib, decanolactona y ácido sebácico no disminuyeron el score convulsivo por lo que no presentaron actividad anticonvulsivante frente a las crisis inducidas por MP.
- Estos resultados fueron útiles para la elección de los compuestos a administrar a lo largo del tratamiento prolongado de MP.

Solo fueron utilizados aquellos que no disminuyen la severidad de las crisis, de manera de que, si existe una interferencia en el desarrollo de la farmacoresistencia, ésta no se deba a la disminución de la severidad de las crisis, sino a la inhibición de la COX-2 sobreexpresada como consecuencia de las mismas.

3| Administración prolongada de fármacos inhibidores de COX-2 para la prevención de resistencia a PHT en el modelo recientemente desarrollado.

Se utilizaron ratones NIH: Swiss machos entre 25 y 30 g. Luego del período de adaptación y manipulación, 9 animales por grupo fueron administrados durante 23 días, con celecoxib (10 mg/kg i.p.), ácido sebácico (100 mg/kg i.p.) o γ -decanolactona (400 mg/kg i.p.) y, 30 min más tarde con dosis convulsivante de MP (de 30 a 36 mg/kg i.p.). Este tratamiento se repitió de lunes a viernes, durante 23 administraciones. El grupo control no recibió tratamiento previo a MP. El día 24, todos los ratones fueron administrados con PHT 18 mg/kg, i.p. y, 2 hs después MP 36 mg/kg, i.p.

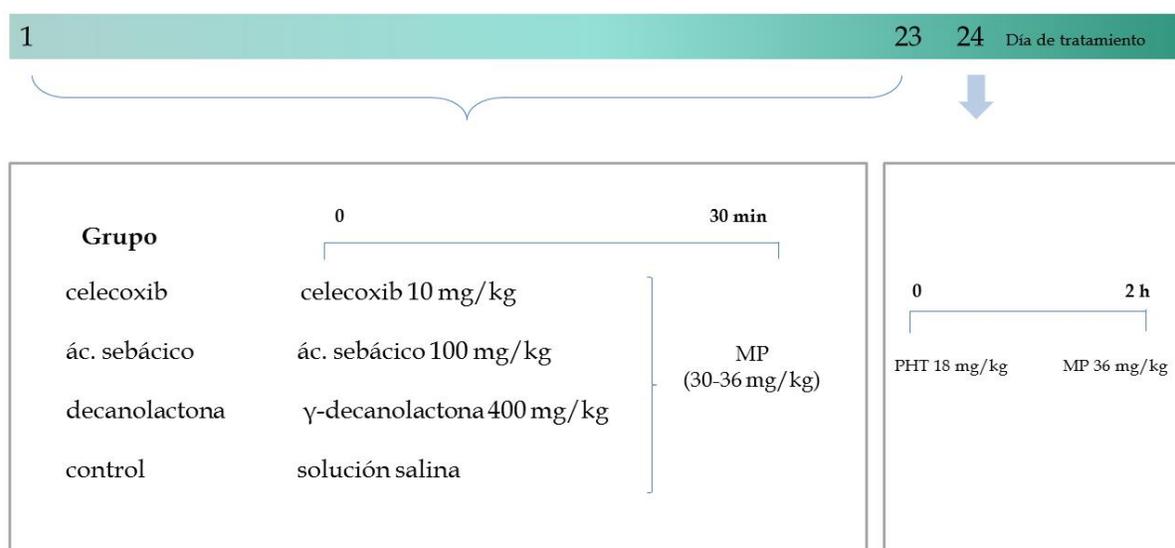
Se evaluó el score convulsivo y la latencia de las convulsiones generalizadas para cada grupo, durante los 23 días de tratamiento con MP y en el día 24, luego de

la administración de PHT. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, seguido de test de Dunnett para comparar cada uno de los grupos con el grupo control.

Para el análisis de las latencias en los 23 días de tratamiento, se transformaron los datos logarítmicamente ya que de esa forma se cumplen los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Se ajustaron los datos a un modelo lineal mixto, considerando a la variable "tratamiento" como factor fijo, y al tiempo como factor aleatorio. Se modeló la correlación entre los tiempos con un modelo autoregresivo de orden 1.

Se utilizó GraphPad Prism 5.0 para la realización de los gráficos y análisis estadísticos.

La siguiente figura esquematiza el tratamiento completo.



Resultados:

- Los grupos tratados con ácido sebácico, γ -decanolactona y celecoxib tuvieron un comportamiento similar al grupo control durante los 23 días de tratamiento. Todos tuvieron convulsiones con un score promedio entre 4-5 a partir del día 8 (Figura 2). Las medias del score por tratamiento no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

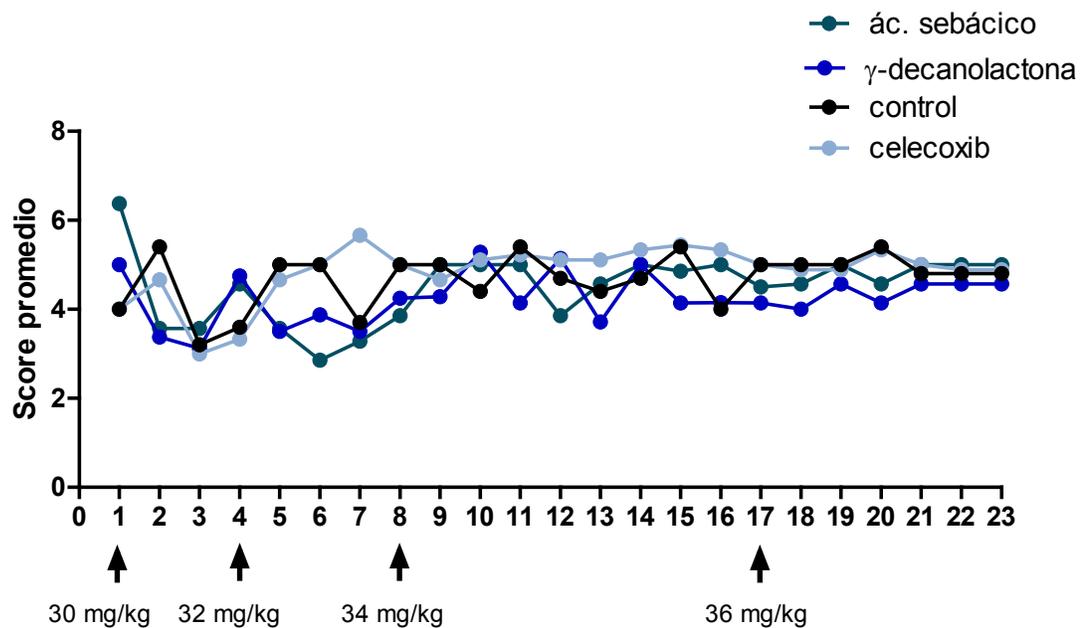


Figura 2: Score convulsivo observado a lo largo del tratamiento con MP según los distintos co-tratamientos. (N=9)

- Respecto a la latencia de las convulsiones generalizadas, todos los tratamientos presentaron una latencia mayor a la del grupo control ($p < 0,001$), lo cual manifiesta un efecto protector por parte de los mismos. Sin embargo, el aumento de la latencia para el tratamiento con celecoxib fue mayor que para ácido sebácico y γ -decanolactona ($p < 0,001$), lo cual indica un mayor efecto protector por parte del primero. (Figura 3)

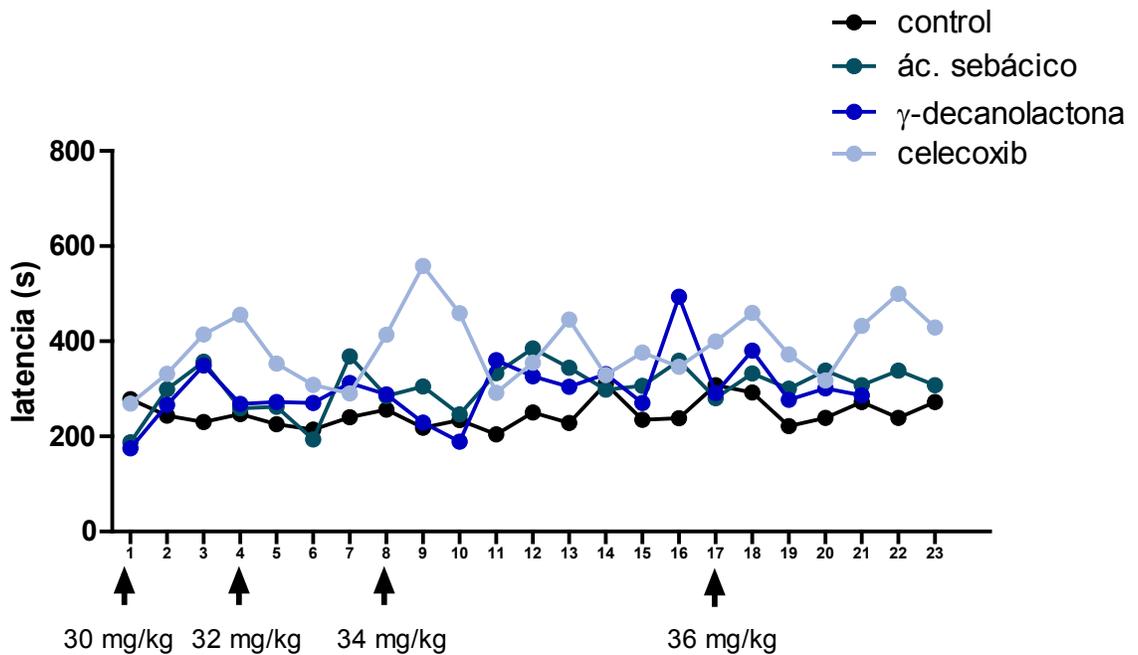


Figura 3A: Latencias de convulsiones generalizadas observadas a lo largo del tratamiento con MP según los distintos co-tratamientos. (N=9)

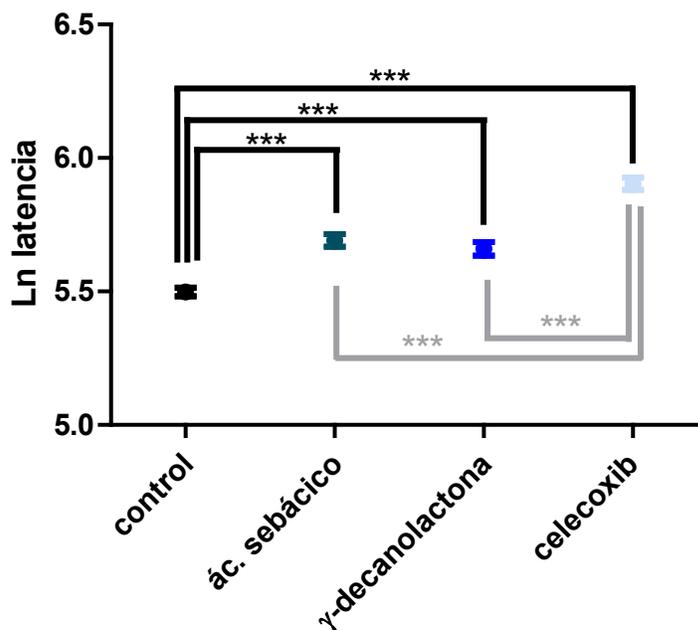


Figura 3B: Promedio de las latencias a lo largo de los 23 días de tratamiento. Ln de la latencia \pm SEM vs. co-tratamiento. *** $p < 0,001$.

- Al finalizar el tratamiento con MP, el porcentaje de mortalidad fue del 10% para el grupo control, del 12.5% para los grupos que tuvieron co-tratamiento con decanolactona y sebácico y del 0% para los ratones co-administrados con celecoxib. No hubo diferencia significativa para estos porcentajes ($p < 0,05$).
- El día 24, todos los grupos que recibieron co-tratamiento con inhibidores de COX-2 respondieron sensiblemente a los efectos anticonvulsivantes de PHT, disminuyendo el score convulsivo con respecto al grupo control. (Figura 4)

- Respecto al porcentaje de animales que presentaron crisis generalizadas, es decir, el porcentaje de animales que mostraron resistencia a PHT, solo los grupos co-tratados con celecoxib o ácido sebácico presentaron una disminución estadísticamente significativa. Los animales tratados con γ -decanolactona mostraron una tendencia a disminuir dicho porcentaje, aunque no resultó significativa. (Figura 5)

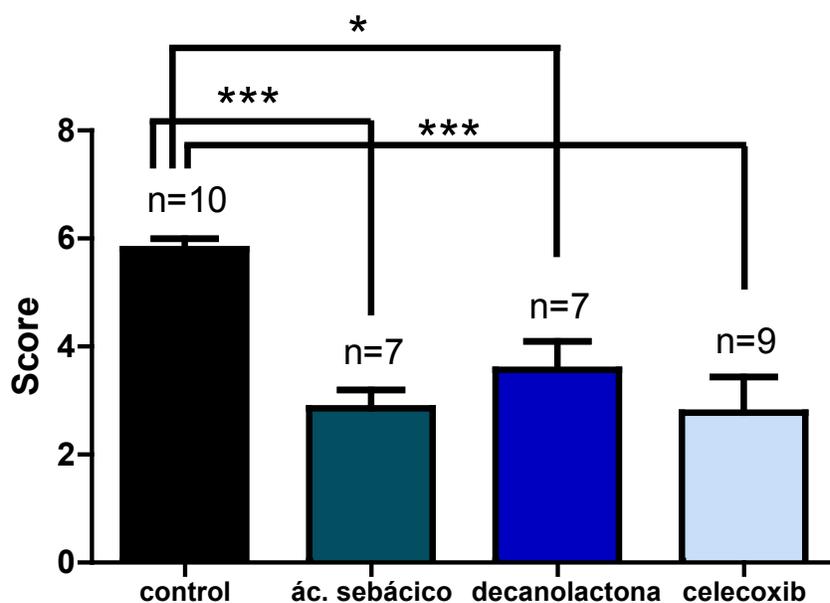


Figura 4: Respuesta observada el día 24 en presencia de PHT, representado como media de score \pm SEM para los diferentes co-tratamientos.* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

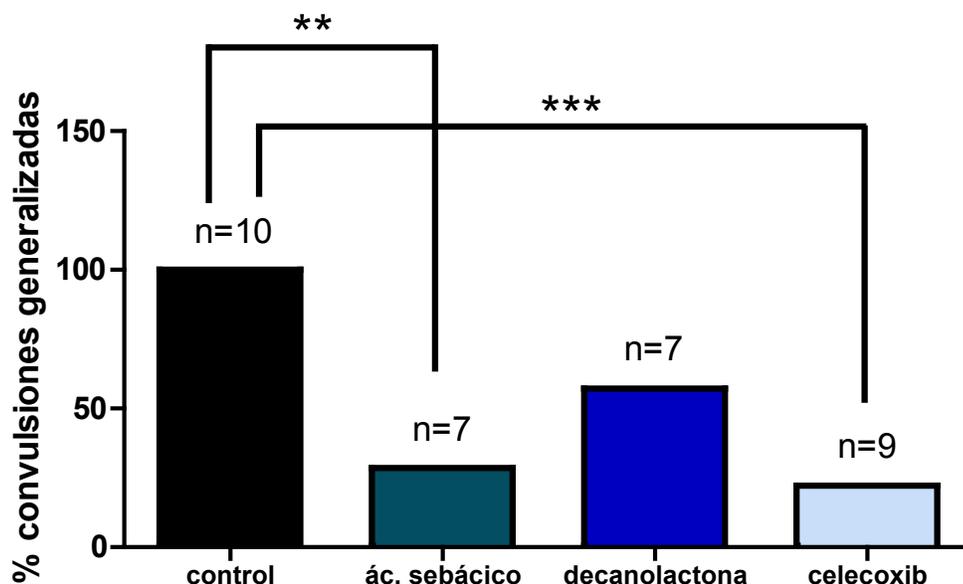


Figura 5: Respuesta observada el día 24 en presencia de PHT, representado como % de animales que presentaron convulsiones generalizadas (score > 4) según co-tratamiento. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Todos los compuestos seleccionados como inhibidores de COX-2 mostraron efectos anticonvulsivante en el modelo MES, inhibiendo las convulsiones tónico-clónicas. Ácido sebácico y fenilbutirato de sodio también fueron activos frente a s.c.PTZ, mostrando actividad protectora frente a convulsiones generalizadas. El único compuesto evaluado que mostró efecto anticonvulsivante frente a las convulsiones inducidas por MP fue fenilbutirato de sodio. En este caso, que no proteja las convulsiones es una característica indispensable para poder evaluar la inhibición de la sobreexpresión de Pgp,

debido a que las crisis son el estímulo que desencadena la sobreexpresión.

Ácido sebácico y γ -decanolactona cumplen con esta condición y por lo tanto fueron evaluados en el modelo MP23 como tratamiento preventivo del desarrollo de farmacoresistencia por sobreexpresión de Pgp.

Tanto el co-tratamiento con ácido sebácico como con γ -decanolactona durante los 23 días de estimulación convulsiva disminuyeron significativamente el score convulsivo de los animales el día 24, cuando se evaluó PHT. Ambos fármacos tuvieron un efecto preventivo similar al celecoxib, inhibidor selectivo de COX-2. Respecto del porcentaje de animales que presentaron resistencia solo el ácido sebácico, además de celecoxib, redujo significativamente este porcentaje. En el capítulo VI se discuten los resultados.

Referencias:

Bauer B, Hartz AM, Pekcec A, Toellner K, Miller DS, Potschka H (2008) Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling. *Mol Pharmacol.*73:1444-1453.

Coelho de Souza GP, Elisabetsky E, Nunes DS, et al. (1997) Anticonvulsant properties of γ -decanolactone in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 58:175-181.

Jaenisch N, Liebmann L, Guenther M, et al. (2016) Reduced tonic inhibition after stroke promotes motor performance and epileptic seizures. *Sci Rep.* 6:26173.

Jiang J, Quan Y, Ganesh T, et al. (2013) Inhibition of the prostaglandin receptor EP2 following status epilepticus reduces delayed mortality and brain inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(9):3591-3596.

Jones BJ, Roberts DJ (1968) The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol.* 20:303-304.

Rojas A, Jiang J, Ganesh T, et al. (2014) Cyclooxygenase-2 in epilepsy. *Epilepsia.* 55(1):17-25.

Schlichtiger J, Pekcec A, Bartmann H, et al (2010) Celecoxib treatment restores pharmacosensitivity in a rat model of pharmacoresistant epilepsy. *British Journal of Pharmacology*, 160:1062-1071.

Serrano GE, Lelutiu N, Rojas A, et al. (2011) Ablation of cyclooxygenase-2 in forebrain neurons is neuroprotective and dampens brain inflammation after status epilepticus. *Neurosci.* 31(42):14850-14860.

Skilbeck K, Jhonston G, Hinton T (2010). Stress and GABA_A receptors. *Journal of Neurochemistry* 112:1115-1130.

Talevi A, Prieto J, Bruno Blanch LE, et al. (2007) New similarity-based algorithm and its application to classification of anticonvulsant compounds. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 22(3): 253-265.

Tayal V, Kalra BS, Chawla S (2008) Effect of celecoxib on anticonvulsant activity of carbamazepine against maximal electroshock-induced convulsions in mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 30 (10):727-30.

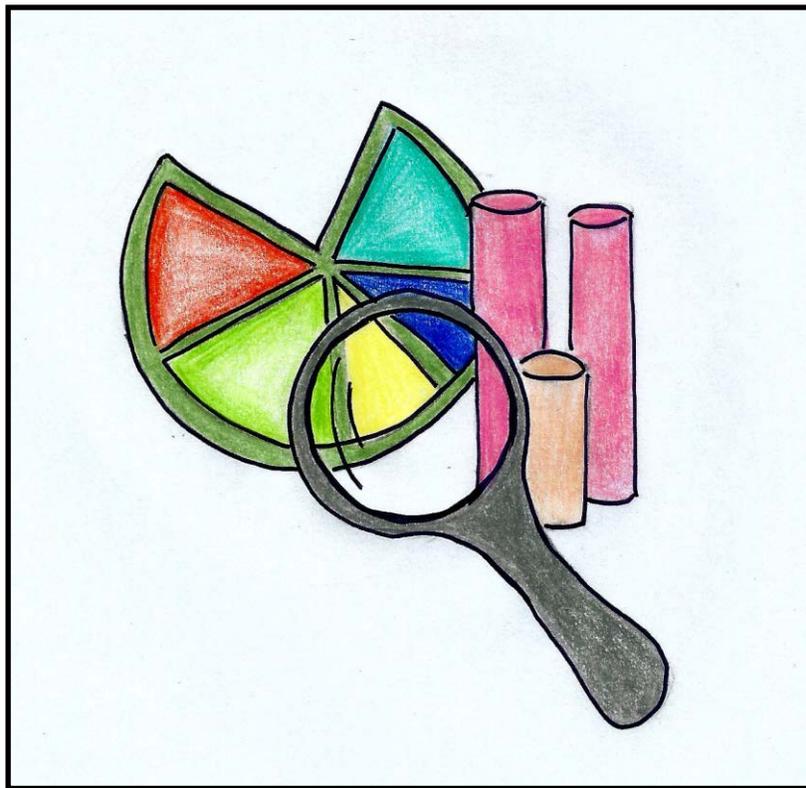
White HS, Smith-Yockman M, Srivastava A, et al. (2006) Therapeutic assays for the identification and characterization of antiepileptic and antiepileptogenic drugs. In: Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé SL, editors. *Models of seizures and epilepsy*. Elsevier: Amsterdam.

Zandieh A, Maleki F, Hajimirzabeigi A, et al. (2010) Anticonvulsant effect of celecoxib on pentylenetetrazoleinduced convulsion: modulation by NO pathway. *Acta Neurobiol Exp.* 70: 390-397.

Zibell G, Unkrüer B, Pekcec A, et al. (2009) Prevention of seizure-induced up-regulation of endothelial P-glycoprotein by COX-2 inhibition. *Neuropharmacology* 56: 849-855.

CAPÍTULO VI

Discusión y Conclusiones



Capítulo VI

Discusión y Conclusiones

Desarrollo del modelo de convulsiones farmacorresistentes en ratones:

Hemos desarrollado un nuevo modelo de convulsiones farmacorresistentes con las siguientes consideraciones:

- El modelo consiste en la inducción de convulsiones generalizadas diarias, mediante la administración de una dosis convulsivante de MP.
- La resistencia aumenta gradualmente cuando se aumenta el número de administraciones. Se requieren 23 administraciones de MP para conseguir un 100% de resistencia a PHT.
- Se requiere el incremento de la dosis de MP a lo largo del tratamiento, empezando con 30 mg/kg e incrementando de a 0,2 mg/kg cuando disminuye la severidad de las crisis, llegando a una dosis de 36 mg/kg al final de tratamiento, de manera de que los animales presenten crisis generalizadas todos los días.

Este incremento en la dosis de MP durante el tratamiento sugiere un aumento del umbral convulsivo (tolerancia a los estímulos convulsivos); en contraste con la disminución del umbral observado en modelos de *kindling*

(*Mason & Cooper 1972; Leclercq et al 2014; Racine 1972*). Sin embargo hemos demostrado que los ratones MP23 sufren una disminución del umbral convulsivo 6 semanas después del tratamiento, lo que podría responder a un proceso epileptogénico. Por otro lado, la disminución de la respuesta frente a MP podría deberse a la sobreexpresión de Pgp observada (aunque hasta el momento no hay estudios que demuestren que MP es sustrato de Pgp), así como a la alteración de cualquier otro elemento involucrado en el metabolismo de este compuesto.

- Los animales MP23 mostraron una expresión aumentada de la Pgp en corteza cerebral, hipocampo y estriado, la cual fue evidenciada por inmunohistoquímica y western blot. La expresión de BCRP, evaluada mediante western blot, no presentó diferencias entre los animales MP23 y control.
- La resistencia a PHT fue extendida a PB (también sustrato de Pgp), sin embargo, no se extiende a fármacos no sustratos de Pgp (CBZ, DZP y LEV).
- DZP y LEV provocan protección en animales MP23 incluso a dosis que no son eficaces en animales control, lo que sugiere que la actividad anticonvulsiva observada en cerebros que han sufrido repetidas convulsiones no se presenta frente a un episodio agudo. Esto concuerda con un reporte de *Ohno et al (2010)* en donde ha sido observado que LEV en

una dosis similar es capaz de inhibir convulsiones inducidas por PTZ en animales *kindled*, siendo la misma dosis sub-antivconvulsivante para animales *naïve*. Ellos encontraron un aumento en los niveles de la proteína SV2A (principal sitio de acción de LEV), específicamente en interneuronas GABAérgicas de hilus hipocampal de animales *kindled* (*Ohno et al 2009*). Los autores plantean que, dado que se ha demostrado que la acción anticonvulsiva de LEV está estrechamente asociada con el nivel de expresión de SV2A (*Kaminski et al 2009*), la inhibición por LEV de las convulsiones inducidas por PTZ, selectivamente observada en animales *kindled* podría estar relacionada con el incremento del nivel hipocampal de SV2A inducido por kindling.

De esta manera, la protección de LEV y DZP en MP23 podría estar también asociada a la alteración de los blancos moleculares (SV2A y receptor GABA_A respectivamente). De manera opuesta, el blanco de CBZ (canales de sodio voltaje dependientes) parece estar inalterado ya que los animales MP23 también fueron protegidos en las dosis evaluadas. Se requieren más estudios para determinar los efectos de la administración repetida de MP sobre los blancos mencionados.

- La reversión de la resistencia en un 100% mediante la administración de NIMO (bloqueante de Pgp) establece una relación entre la resistencia a PHT y la sobreexpresión de Pgp. Una menor reversión fue

observada para el caso de PB, probablemente debido a que PB es sustrato de otras proteínas ABC, como MRP₅ (*Luna Tortós et al 2008*), para las cuales no se estudió la expresión en este modelo.

- Los ratones MP23 no mostraron resistencia a PHT cuando se evaluó su actividad en MES test. Esto concuerda con otros estudios que indican que, en animales epilépticos (obtenidos mediante modelo de pilocarpina) disminuye la susceptibilidad frente a PTZ y 6 Hz pero no frente a MES test (*Bankstahl et al 2013; Blanco et al 2009*). Una posible explicación de la diferencia en la respuesta según el modelo son las diferentes estructuras cerebrales involucradas en la generación de las convulsiones, las cuales podrían ser afectadas o no durante el período de epileptogénesis. Se cree que las convulsiones tónicas inducidas por electroshock en el ensayo MES se originan en el tronco cerebral, mientras que las crisis mioclónica y clónicas inducidas por PTZ surgen de las estructuras del cerebro anterior (*Löscher & Ebert 1996*). En el presente trabajo hemos evaluado la sobreexpresión de Pgp, como mecanismo de resistencia, en estructuras que forman parte del cerebro anterior por lo que se desconoce, hasta el momento, si la expresión de Pgp en el tronco encefálico se ve afectada en este modelo.

- Los animales MP23 mostraron una susceptibilidad aumentada a las convulsiones clónicas generalizadas y tónicas inducidas por

administración de PTZ. Estos datos sugieren que existe un proceso epileptogénico que se desarrolla con la inducción de crisis repetidas, lo cual provoca una disminución del umbral convulsivo. Sin embargo sería útil realizar estudios de ECG y monitorización continua para detectar actividad epiléptica espontánea.

Inhibidores de COX-2 como tratamiento adicional a la terapia antiepiléptica.

- Todos los compuestos seleccionados, mediante modelos computacionales, como inhibidores de COX-2 y anti-MES y evaluados en modelos agudos, mostraron actividad anticonvulsivante en el modelo MES, lo que confirma la capacidad predictiva del algoritmo anti-MES.
- Ácido sebácico, fenilbutirato de sodio (determinados en el laboratorio) y γ -decanolactona (reportado anteriormente) mostraron también actividad anticonvulsivante en el modelo PTZ lo cual les confiere un amplio espectro de actividad.
- Solo fenilbutirato de sodio fue activo frente a las crisis agudas inducidas por MP. Los compuestos utilizados en la evaluación de la inducción de resistencia en el modelo MP23 deben, necesariamente, cumplir con la condición de no proteger las crisis inducidas por MP, de manera que, el estímulo para la sobreexpresión de Pgp, es decir, las crisis convulsivas, estén presentes y tengan la misma severidad que para los animales control.

Por lo tanto, los compuestos utilizados en dichas evaluaciones fueron ácido sebácico y γ -decanolactona. Los resultados fueron comparados con los correspondientes al co-tratamiento con celecoxib.

- Celecoxib, Ácido sebácico y, en menor medida, γ -decanolactona mostraron ser eficaces en la prevención del desarrollo de resistencia a PHT inducida en el modelo MP23. Los tres fármacos evaluados mostraron un aumento de la latencia de las crisis generalizadas, siendo mayor para el caso de celecoxib. Sin embargo, no hubo diferencia en el score convulsivo. Estos resultados sugieren que los nuevos compuestos previenen la sobreexpresión de Pgp inducida por las convulsiones. Será necesario el estudio en cerebros de animales tratados de manera de evaluar si la expresión de Pgp es normal, o al menos se encuentra disminuida en comparación con los animales sin tratamiento con inhibidores de COX-2 (resistentes a PHT). Además será necesaria la evaluación de la actividad inhibitoria de COX-2 de manera de confirmar el mecanismo propuesto.

Ventajas y limitaciones del nuevo modelo

Es importante señalar que los modelos actuales de epilepsia resistente a los fármacos requieren tiempos extremadamente largos para su implementación, debido al período de inducción de resistencia y el tratamiento posterior que se utiliza para la selección de animales resistentes. Los modelos que generan animales

epilépticos que tienen convulsiones espontáneas después de la inducción de un SE (por la administración de pilocarpina, ácido kaínico o estimulación eléctrica prolongada de la amígdala basolateral (BLA)) requieren 6 semanas después de la inducción de SE hasta que los animales exhiben convulsiones espontáneas y luego otras 6 semanas para la selección de animales resistentes (*Bankstahl & Löscher 2012*). Los modelos de *kindling* requieren aproximadamente 8 semanas después de la implantación de los electrodos hasta que se alcanza el estado *kindled*, y entre 6 y 8 semanas adicionales para la selección de animales resistentes (*Löscher 2006*). Por este motivo, el modelo MP23 puede ser una excelente alternativa para la evaluación de nuevos fármacos, considerando que tiene la ventaja de generar animales resistentes en sólo 23 días, con un 80% de supervivencia y con un 100% de animales PHT-resistentes y un 80% PB-resistentes. Vale la pena mencionar que los modelos disponibles de crisis espontánea logran alrededor de un 35% de animales PB-resistentes, teniendo en cuenta sólo los animales que desarrollan convulsiones espontáneas (*Bankstahl & Löscher 2012; Brandt & Löscher 2014*), mientras que el modelo de *kindling* de amígdala alcanza entre el 12 y el 23% de resistencia a PHT (*Löscher et al 1993; Löscher 2011; Potschka 2012*).

Curia et al. ha realizado una revisión de la tasa de mortalidad obtenida en diferentes laboratorios para el modelo de pilocarpina, con y sin litio, encontrando que varía entre 22 y 56% (*Curia et al., 2008*). Ahmad et al. ha reportado que la tasa de mortalidad puede llegar hasta un 50%, dependiendo de la cepa utilizada, para

el modelo del AK en ratones y solo el 44% de los animales sobrevivientes alcanzan CERs, reduciendo el rendimiento al 22% (*Ahmad et al 2013*). Los modelos de kindling eléctrico tienen menor mortalidad que los modelos de inducción química (*Kandratavicius et al 2014*), sin embargo no todos los animales alcanzan el estado kindled. En contraposición, todos los animales sobrevivientes del modelo MP23 (80%) son útiles para la evaluación de fármacos.

El alto porcentaje de resistencia conseguido en nuestro modelo elimina la necesidad de seleccionar no respondedores mediante la administración de fármacos antiepilépticos antes de la evaluación de los candidatos suponiendo que todos los animales son resistentes. Esto representa una gran ventaja debido a que los antiepilépticos utilizados en la etapa de selección podrían alterar la respuesta del fármaco a ensayar (por ejemplo, debido a alteraciones farmacocinéticas inducidas por el fármaco utilizado en la etapa de selección).

La principal ventaja de este modelo, la cual impulsó la realización de esta tesis doctoral, es la utilización de ratones como animal de experimentación, que permite la evaluación de nuevos fármacos utilizando pequeñas cantidades de los mismos.

El modelo recientemente desarrollado es un modelo de convulsiones farmacorresistentes, pero hasta el momento no se ha demostrado que sea un modelo de epilepsia. Es necesaria la realización de estudios sobre animales MP23 para la identificación de actividad epiléptica (Ej.: estudios electroencefalográficos,

medida del umbral convulsivo, monitorización continua para la detección de convulsiones espontáneas).

Perspectivas

Consideramos que el modelo desarrollado, al que llamamos modelo MP23, podría ser de gran utilidad en la evaluación de nuevos fármacos para el tratamiento de la epilepsia refractaria, especialmente para aquellos que pretenden ser activos en los casos de farmacorresistencia por sobreexpresión de Pgp. Nosotros proponemos la incorporación del modelo MP23 en el árbol de decisiones para la evaluación de nuevos fármacos.

Se propone que, aquellos compuestos con actividad anticonvulsivante demostrada, que hayan sido evaluados en modelos *in vitro* demostrando alguna propiedad que resulte beneficiosa para el tratamiento de la epilepsia refractaria (ej.; no sustratos de Pgp, inhibidores de COX-2 u otro elemento de la cascada), sean evaluados en el modelo MP23. Esta evaluación permitirá la selección de compuestos prometedores los cuales podrán ascender a las siguientes fases de evaluación en modelo de epilepsia en rata (fig. 1).

Además, este modelo podría ser utilizado para el estudio de los mecanismos implicados en la farmacorresistencia, pero lo que resulta todavía más interesante es la utilización de este modelo en la evaluación de fármacos que la prevengan.

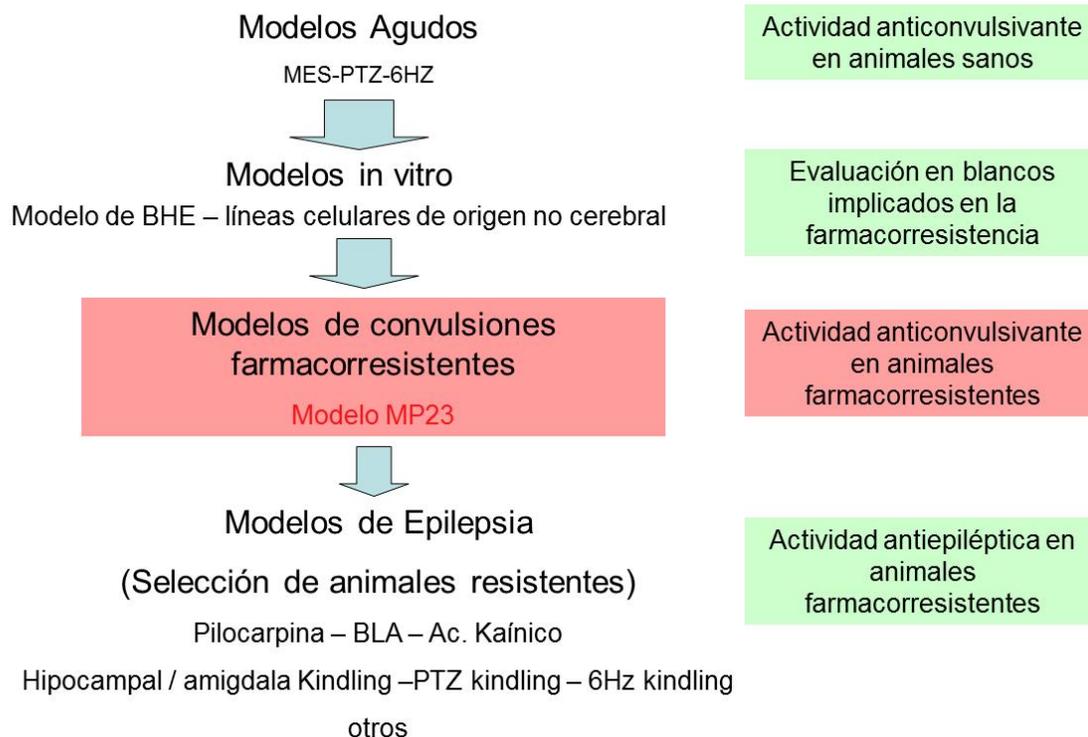


Figura 1: Incorporación del modelo MP23 al esquema de evaluación de nuevos fármacos antiepilépticos.

Por último, se plantea como perspectiva la realización de las evaluaciones pertinentes a dilucidar las incógnitas que han surgido a partir del desarrollo de la presente tesis.

- Estudiar los niveles de expresión de MRPs en animales MP23.
- Estudiar los niveles de expresión de Pgp a nivel del tronco encefálico en animales MP23.
- Evaluar el proceso epileptogénico en el modelo MP23 mediante estudios electroencefalográficos, neurogénesis, gliosis, etc.

- Evaluar, mediante ensayos enzimáticos, la actividad inhibitoria de COX-2 de ác. sebácico y γ -decanolactona.
- Estudiar la expresión de Pgp y COX-2 en animales MP23 co-tratados con ácido sebácico y γ -decanolactona.

Referencias:

- Ahmad N, Yow H, Makmor-Bakry M, et al. (2013) Seizure attainment and mortality of mice in kainite-induced status epilepticus. *Int J Pharm Pharm Sci* 5(3):145-147.
- Bankstahl M, Löscher W. (2012) Inter-individual variation in the anticonvulsant effect of phenobarbital in the pilocarpine rat model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol*, 234(1):70-84.
- Bankstahl M, Bankstahl JP, Löscher W. (2013) Pilocarpine-induced epilepsy in mice alters seizure thresholds and the efficacy of antiepileptic drugs in the 6-Hertz psychomotor seizure model. *Epilepsy Research*, 107(3):205-216.
- Blanco MM, Dos Jr. SJ, Perez-Mendes P, et al. (2009) Assessment of seizure susceptibility in pilocarpine epileptic and nonepileptic Wistar rats and of seizure reinduction with pentylene tetrazole and electroshock models. *Epilepsia*, 50:824-831.
- Brandt C, Löscher W. (2014) Antiepileptic efficacy of lamotrigine in Phenobarbital resistant and responsive epileptic rats: A pilot. *Epilepsy Research*, 108:1145-1157.
- Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M. (2008) The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods*, 172(2):143-157.
- Kaminski RM, Gillard M, Leclercq K, et al. (2009) Proepileptic phenotype of SV2A-deficient mice is associated with reduced anticonvulsant efficacy of Levetiracetam. *Epilepsia*, 50:1729-1740.
- Kandratavicius L, Alves Balista P, Lopes-Aguiar C, et al. (2014) Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 10:1693-1705.
- Leclercq K, Matagne A, Kaminski RM. (2014). Low potency and limited efficacy of antiepileptic drugs in the mouse 6 Hz corneal kindling model. *Epilepsy Research*, 108:675- 683.
- Löscher W, Ebert U. (1996). Basic mechanisms of seizure propagation: Targets for rational drug design and rational polypharmacy. *Epilepsy Research*, 11:17-44.
- Löscher W, Rundfeldt C, Hönack D. (1993) Pharmacological characterization of phenytoin-resistant amygdala-kindled rats, a new model of drug-resistant partial epilepsy. *Epilepsy Research*, 15(3):207-219.
- Löscher W. (2006) Animal Models of Drug-Refractory Epilepsy, in: Asla Pitkänen, Philip A. Schwartzkroin and Solomon L. Moshé (Eds), *Models of Seizures and Epilepsy*. 1st Edn. Elsevier, Burlington, USA.

Löscher W. (2011) Critical Review of current animal models of seizure and epilepsy used in discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*, 20:359-368.

Luna Tortós C, Fedrowitz M, Löscher W. (2008) Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein. *Neuropharmacology*, 55:1364-1375.

Mason CR, Cooper RM. (1972) A permanent change in convulsive threshold in normal and brain-damaged rats with repeated small doses of pentylenetetrazol. *Epilepsia*, 13:663-674.

Ohno Y, Ishihara S, Terada R, et al. (2009) Preferential increase in the hippocampal synaptic vesicle protein 2A (SV2A) by pentylenetetrazole kindling. *Biochem Biophys Res Commun*, 390:415-420.

Ohno Y, Ishihara S, Terada R, et al. (2010) Antiepileptogenic and anticonvulsive actions of levetiracetam in a pentylenetetrazole kindling model. *Epilepsy Research* 89:360-364.

Potschka H. (2012) Animal models of drug-resistant epilepsy. *Epileptic Disord*, 14(3):226-34.

Racine RJ. (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 32(3):281-94.



Detalle de las publicaciones, presentaciones a congresos y estadias de investigación realizadas durante el período en el que se desarrolló la presente tesis doctoral:

En el transcurso de estos años se han publicado 22 presentaciones a congresos, 2 presentaciones orales, 10 publicaciones en revistas internacionales y 2 capítulos de libro.

Publicaciones en revistas internacionales:

Título: "Synthesis and Anticonvulsant Activity of Amino Acid-Derived Sulfamides"

Publicación: Journal of Medicinal Chemistry , 2009, 52 (6), pp 1592-1601

Autores: Luciana Gavernet, Juan E. Elvira, Gisela A. Samaja, Valentina Pastore, Mariana Sella Cravero, Andrea Enrique, Guillermina Estiu y Luis E. Bruno- Blanch.

Con referato: si

Tipo de trabajo: completo

Idioma en que fue publicado el artículo: inglés.

Título: "N,N'-dicyclohexylsulfamide and N,N'-diphenethylsulfamide are anticonvulsant sulfamides with affinity for the benzodiazepine binding site of the GABAA receptor and anxiolytic activity in mice."

Publicación: Biochemical Pharmacology, 2012, 83, pp 253-259.

Autores: Cristina Wasowski; Luciana Gavernet; Ivana A Barrios; Maria L Villalba; Valentina Pastore; Gisela Samaja; Andrea Enrique; Luis E Bruno-Blanch; Mariel Marder.

Con referato: si

Tipo de trabajo: completo

Idioma en que fue publicado el artículo: inglés.

Título: Anticonvulsant activity of artificial sweeteners: a structural link between sweet-taste receptor T1R3 and metabotropic glutamate receptors

Publicación: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012 Jun 15;22(12):4072-4

Autores: Alan Talevi , Andrea V. Enrique, Luis E. Bruno-Blanch

Con referato: si

Idioma en que fue publicado: inglés

Título: Several New Diverse Anticonvulsant Agents Discovered in a Virtual Screening Campaign Aimed at Novel Antiepileptic Drugs to Treat Refractory Epilepsy.



Publicación: Journal of Chemical Information and Modeling. Dic. 2012 21; 52(12):3325-30.

Autores: Mauricio E. Di Ianni, Andrea V. Enrique, Pablo H. Palestro, Luciana Gavernet, Alan Talevi and Luis E. Bruno-Blanch

Con referato: si

Idioma en el que fue publicado: inglés

Título: Synthesis and anticonvulsant activity of bioisosteres of trimethadione, N-derivative-1,2,3-oxathiazolidine-4-one-2,2-dioxides from α -hydroxyamides

Publicación: Bioorganic & Medicinal Chemistry 21 (2013) 841-846

Autores: Valentina Pastore, Laureano Sabatier, Andrea Enrique, Mariel Marder, Luis E. Bruno-Blanch.

Con referato: si

Idioma en el que fue publicado: inglés

Título: Is there a relationship between sweet taste and seizures?

Anticonvulsant and proconvulsant effects of non-nutritive sweeteners.

Publicación: Comb Chem High Throughput Screen 2015;18(4):335-45

Autores: Mauricio E. Di Ianni, Andrea V. Enrique, María E. Del Valle, Blanca Aldana, María A. Rosella, Luisa Rocha, Eduardo A. Castro, Luis E. Bruno-Blanch, Alan Talevi.

Con referato: si

Idioma en el que fue publicado: inglés

Título: "Computer-aided identification of anticonvulsant effect of natural non-nutritive sweeteners Stevioside and Rebaudioside A"

Publicación: Assay Drug Dev Technol. 2015 Jul-Aug;13(6):313-8. doi: 10.1089/adt.2015.29010.meddr

Autores: Mauricio E. Di Ianni, María E. Del Valle, Andrea V. Enrique, María A. Rosella, Fiorella Bruno, Luis E. Bruno-Blanch, Alan Talevi.

Con referato: si

Idioma en el que fue publicado: inglés

Título: Computer-Aided Recognition of ABC Transporters Substrates and Its Application to the Development of New Drugs for Refractory Epilepsy

Publicación: Mini-reviews in Medicinal Chemistry 2016. ISSN: 1389-5575.

Autores: Manuel Couyoupetrou, Melisa Edith Gantner, Mauricio Di Ianni; Pablo Palestro, Andrea Enrique, Luciana Gavernet, María Esperanza Ruiz, Guido Pesce, Alan Talevi, Luis Bruno Blanch.

Con referato: si

Idioma en el que fue publicado: inglés

Título: Novel sulfamides and sulfamates derived from amino esters: Synthetic studies and anticonvulsant activity
 Publicación: European Journal of Pharmacology 774 (2016) 55–63
 Autores: Maria L. Villalba a , Andrea V. Enrique a , Josefina Higgs b , Rocío A. Castaño a , Sofía Goicoechea a , Facundo D. Tabora a , Luciana Gavernet a,n , Ileana D Lick c , Mariel Marder b , Luis E. Bruno Blanch
 Con referato: si
 Idioma en el que fue publicado: inglés

Título: New model of pharmaco-resistant seizures induced by 3-mercaptopropionic acid in mice.
 Publicación: Epilepsy Research 129 (2017) 8–16.
 DOI:10.1016/j.epilepsyres.2016.10.012
 Autores: Andrea Enrique, Sofía Goicoechea, Rocío Castaño, Facundo Tabora, Luisa Rocha, Sandra Orozco, Elena Girardi, Luis Bruno Blanch.
 Con referato: si
 Idioma en el que fue publicado: inglés.

Capítulos de libro:

Autores : Carolina L. Bellera, Andrea V. Enrique, Alan Talevi, Luis E. Bruno-Blanch
 Título : Advances on applications of nanotechnology to drug delivery: a biopharmaceutical perspective
 Libro : Nanoscience and Computational Chemistry: Research Progress
 Editorial: Apple Academic Press (September 30, 2013)
 Idioma: Inglés
 ISBN-10: 1926895592
 ISBN-13: 978-1926895598
<http://www.amazon.com/Nanoscience-Computational-Chemistry-Research-Progress/dp/1926895592>

Autores : Andrea Enrique, Carolina Bellera, Alan Talevi
 Título : Metabolismo y Excreción de Fármacos
 Libro : Procesos Biofarmacéuticos
 Editorial: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP)
 Idioma: Español
 Año : 2016
 ISBN: 978-950-34-1312-8
<http://hdl.handle.net/10915/51907>



3 estancias de investigación en el extranjero:

Estancia de investigación realizada en el Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) – México, bajo la dirección de la Dra. Luisa L. Rocha, desde el 1 al 31 de Mayo de 2010 en el marco del proyecto “Diseño y evaluación de nuevos fármacos orientados al tratamiento de la epilepsia fármaco resistente y epileptogénesis”.

Estancia de investigación realizada en el Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) – México, bajo la dirección de la Dra. Luisa L. Rocha, desde el 30 de septiembre al 10 de Noviembre de 2012 en el marco del proyecto “Evaluación de los efectos de nuevas drogas antiepilépticas en modelos experimentales de crisis epilépticas, epileptogénesis y daño neuronal inducido por el estatus epiléptico”.

Estancia de investigación realizada en la Unidad de Investigaciones Médicas en Enfermedades Neurológicas, Centro Médico Nacional, DF, México, bajo la dirección de la Dra. Sandra Orozco Suarez, desde el 1 al 31 de Junio de 2015 en el marco del proyecto “Evaluación de los efectos del Propilparabeno en el Status Epilepticus y Daño Neuronal Inducido por el Modelo de Litio-Pilocarpina”.

Cursos realizados:

Cursos presentados para el doctorado:

1-Nombre: “Mecanismo de acción de fármacos: desde la membrana al genoma”.

Aprobado.

Institución: Universidad de Buenos Aires – Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Carácter: teórico y práctico.

Carga horaria: 45 hs.

2-Escuela “ Nanotecnología en terapéutica”

Aprobado

Institución: Centro Argentino-Brasileño de Nanotecnología.

Carácter: teórico y práctico

Carga Horaria: 45 hs.

3-Nombre: "Ciencia, tecnología y sociedad: reflexiones epistemológicas, éticas y políticas."

Aprobado

Institución: Universidad de Buenos Aires - Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Carga horaria: 45 hs.

Otros cursos realizados:

4-Nombre: "Diseño Experimental y Determinación del Tamaño de la Muestra en Trabajo con Animales de Laboratorio"

Carácter: teórico y práctico.

Institución: Universidad de Buenos Aires - Facultad de Cs. Exactas y Naturales.

Aprobado.

Carga Horaria: 40 hs.

5-Nombre: III Curso internacional de epilepsia farmacorresistente.

Institución: Centro Médico Nacional, IMSS - México

Carga horaria: 16 hs.

6-Nombre: Pharmacoresistance and neurotoxicity in epilepsy.

Institución: Curso pre-congreso "Iº Congreso F.A.L.A.N."

Aprobado

Carga horaria: 16 hs.

7-Nombre: Séptima Escuela de Verano en Epilepsia - Crisis y epilepsias en los trópicos.

Institución: Escuela Latinoamericana de verano de Epilepsia.

Aprobado.

Carga horaria: 17 - 26 de febrero de 2013- Sao Pablo. Brasil.

8-Nombre: Tratamiento Farmacológico de las Epilepsias.

Institución: Curso ALADE. Pre-congreso VIII Congreso Latinoamericano de Epilepsia.

Asistido

Carga horaria: 2,5 hs. 17 de septiembre de 2014.