

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO



**EVALUACIÓN DE NEOSAXITOXINA COMO FÁRMACO
ANTIEPILÉPTICO EN UN MODELO DE EPILEPSIA DEL LOBULO
TEMPORAL**

TAMARA ISABEL BUSTAMANTE PONCE

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN FISIOLÓGÍA

Directores de Tesis

Dr. José Luis Valdés G.

Dr. Néstor Lagos W.

2020

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la(el) candidata(o)

TAMARA ISABEL BUSTAMANTE PONCE

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Fisiología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día..... (día, mes, año).

**Dr. José Luis Valdés G.
Director de Tesis**

**Dr. Néstor Lagos W.
Codirector de Tesis**

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Dra. Julia Guerrero P.

Dr. Adrian Ocampo G.

Dr. José Luis Castillo C.

**Dr. Pedro Maldonado A.
Presidente Comisión**

DEDICATORIA

A mi niña preciosa, Leonor, por comprender desde tan corta edad que no quiero ser solo mamá en esta vida.

A mis padres, por absolutamente todo.

AGRADECIMIENTOS

Como paciente con epilepsia esta tesis tuvo un propósito que iba más allá de lo académico; por ello y con especial cariño quiero agradecer a cada una de las personas, que de una u otra forma, me acompañaron en esta travesía.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. José Luis Valdés por su apoyo incondicional en el desarrollo de esta tesis, pero sobre todo por motivar mi búsqueda de conocimiento. Desde el primer día en que me aceptó como tesista me sentí libre de expresar tanto mis dudas como mis ideas, lo que resulta invaluable en el proceso de aprendizaje. Aspiro a seguir creciendo en esta forma de estudiar al cerebro que tuve oportunidad de conocer en su laboratorio; los pasos que hoy sigo tienen ese objetivo. Gracias por confiar en mi trabajo.

En segundo lugar quiero agradecer al Dr. Néstor Lagos, quien hace casi 5 años atrás me dio la bienvenida en su laboratorio con la siguiente frase: "Se buscan jóvenes entusiastas y alegres". No puedo más que agradecer la oportunidad de formarme y crecer bajo su dirección, especialmente por enseñarme, sin egoísmo alguno, lo que es el camino de la excelencia. Ya no estoy tan joven, sin embargo, la alegría y el entusiasmo por las ciencias y por crecer como científico persisten.

Quiero agradecer, además, tanto a mis compañeros del Laboratorio de Aprendizaje, Memoria y Neuromodulación como a mis compañeros del Laboratorio Bioquímica de Membrana (a los que están y a los que no). Son personas increíbles y no puedo más que desearles éxito en sus proyectos futuros, sin duda se lo merecen.

De manera especial, quiero agradecer a Andrea Birkner y a don Seba, por ver más allá del estudiante y estar presentes, con pequeños gestos (aunque inmensos para mí), en los momentos más difíciles.

A todos, muchas gracias.

INDICE

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER.....	<i>i</i>
DEDICATORIA.....	<i>ii</i>
AGRADECIMIENTOS.....	<i>iii</i>
INDICE.....	<i>iv</i>
RESUMEN.....	<i>v</i>
ABSTRACT.....	<i>vi</i>
INTRODUCCIÓN.....	1
Modelos animales de epilepsia del lóbulo temporal.....	2
Rol de los canales de sodio dependientes de voltaje en la epilepsia.....	5
Neosaxitoxina como potencial fármaco antiepiléptico.....	7
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
RESULTADOS.....	20
Inducción del status epilepticus por la administración bilateral intrahipocampal de ácido kaínico.....	20
Efecto de la administración de NeoSTX durante la epileptogénesis.....	21
Efecto de NeoSTX cuando es administrada durante la etapa de epilepsia crónica.....	22
Efecto de NeoSTX sobre la incidencia de eventos de alta frecuencia medidos en registros electrofisiológicos <i>in vivo</i>	24
Efecto de NeoSTX sobre la astrogliosis hipocampal.....	31
Efecto de NeoSTX sobre la prevención del deterioro de la memoria dependiente de hipocampo asociado al modelo de TLE.....	33
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	42

RESUMEN

La epilepsia del lóbulo temporal (TLE, por sus siglas en inglés) es la forma más común de epilepsia en adultos. Su signo clínico distintivo es la aparición de crisis espontáneas y recurrentes que pueden ser originadas, entre otras causas, en respuesta a una lesión cerebral que pudo ocurrir muchos años antes; siendo el hipocampo la región más afectada. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el posible efecto antiepileptogénico y anticonvulsivante de Neosaxitoxina (NeoSTX), una ficotoxina que bloquea selectivamente los canales de sodio dependientes de voltaje, en un modelo animal de TLE inducido por la administración intrahipocampal de ácido kaínico, junto con la capacidad de prevenir la gliosis reactiva y proteger del deterioro cognitivo característico de este modelo. El *estatus epilepticus* (SE) fue inducido en cuatro grupos experimentales: (1) animales inyectados bilateralmente con NeoSTX durante la epileptogénesis (inicio a las 24 h después del SE; grupo SE-N, n=4), (2) animales tratados durante la etapa de epilepsia crónica (15 días postSE; grupo EC-N, n=4); siempre con 0.5 μ L de 10 ng/ μ L de NeoSTX (tres veces durante una semana), y los respectivos grupos control en donde se administró un volumen equivalente de solución salina (grupos 2 y 3, SE-S y EC-S, respectivamente, con n=4 cada uno). El potencial de campo local se registró antes y después de cada inyección, mientras que la conducta de todos los animales fue grabada durante la etapa crónica por una semana 2 h diarias. El grado de gliosis reactiva se cuantificó mediante inmunohistoquímica y la funcionalidad del hipocampo se evaluó mediante una tarea de reconocimiento espacial de objetos, antes y después de la intervención experimental.

La incidencia de eventos de alta frecuencia por minuto en el LFP disminuyó toda vez que NeoSTX fue administrada. Sin embargo, la supresión de la actividad eléctrica hipocampal durante la epileptogénesis no incidió sobre el desarrollo de la etapa crónica, siendo comparable con el grupo control. Caso contrario se evidencia con los animales tratados en epilepsia crónica, en donde el número de crisis motoras se redujo con las sucesivas inyecciones de NeoSTX: además, para este mismo grupo se pudo observar una tendencia a la mejora respecto de la funcionalidad hipocampal, variable cuya reversión a niveles normales podría estar sujeta a aumentar la dosis de NeoSTX y/o extender el periodo de tratamiento.

En resumen, NeoSTX tiene potencial como fármaco antiepiléptico puesto que demostró ser capaz de disminuir el número de crisis espontáneas, síntoma primario de esta neuropatología. Se requieren análisis adicionales para determinar si esta intervención farmacológica tiene efectos neuroprotectores a largo plazo, especialmente si el periodo de tratamiento se extiende o se administran distintas dosis. Por otra parte, la ausencia de efecto de la administración de NeoSTX durante la epileptogénesis, concuerda con la hipótesis de la existencia de múltiples mecanismos por los cuales un cerebro puede volverse epiléptico a lo largo de los distintos estados de la patología.

ABSTRACT

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common form of epilepsy in adults. It is characterized by the presence of spontaneous and recurrent seizures that can be caused, among other causes, in response to a brain injury that could occur many years before; where the hippocampus is the most affected region. The main objective of this work was to evaluate the possible antiepileptogenic and anticonvulsant effect of Neosaxitoxin (NeoSTX), a phycotoxin that selectively blocks voltage-gated sodium channels, in an animal model of TLE induced by intra-hippocampal administration of kainic acid, together with the ability to prevent reactive gliosis and protect against cognitive impairment characteristic of this model. *Status epilepticus* (SE) was induced in four experimental groups: (1) animals injected bilaterally with NeoSTX during epileptogenesis (24 h after SE; group SE-N, n=4), (2) animals treated during the stage of chronic epilepsy (15 days postSE; EC-N group, n=4); always with 0.5 μ L of 10 ng/ μ L of NeoSTX (three injections per week), and the respective control groups where an equivalent volume of saline was administered (groups 2 and 3, SE-S and EC-S, respectively, with n=4 each). The local field potential (LFP) was recorded before and after each injection, while the behavior of all animals was video-monitored during the chronic stage 2 h daily for a week. The degree of reactive gliosis was quantified by immunohistochemistry and the hippocampal functionality was evaluated by an object recognition memory task, before and after the experimental intervention.

The incidence of high-frequency events per minute in the LFP decreased every time NeoSTX was injected. However, the suppression of the hippocampal electrical activity during epileptogenesis did not affect the development of the chronic stage, being comparable with the control group. The opposite was observed with animals treated during chronic epilepsy, where the number of seizures was reduced with successive injections of NeoSTX. Even though the memory index did not improve significantly with treatment, the observed tendency suggests that a longer treatment period or a different dose of NeoSTX could lead to recovering normal levels of hippocampal functionality.

NeoSTX has potential as an antiepileptic drug since it proved capable of reducing the number of seizures, which is, controlling the primary symptom of this neuropathology. Additional analyzes are required to determine if this pharmacological intervention has long-term neuroprotective effects, especially if the treatment period is extended or a different dose is administered. Finally, the absence of effects of NeoSTX during epileptogenesis is consistent with the theory that there are multiple mechanisms by which a brain can become epileptic at different stages of the pathology.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la epilepsia corresponde al trastorno neurológico crónico no transmisible más común y de mayor impacto en el mundo, siendo las crisis el signo clínico distintivo. Una crisis se define como un período de excitación anormal y sincrónica de una población neuronal, la cual es capaz de propagarse hacia el resto del cerebro. Un episodio aislado no necesariamente significa epilepsia (≈10% de las personas en todo el mundo tienen una crisis durante su vida), sin embargo, es bien sabido que muy pocos proveedores de atención médica tienen la capacitación para reconocer, diagnosticar y tratar la epilepsia en países de ingresos bajos y medios, donde vive casi el 80% de las personas diagnosticadas. De hecho, se estima que el 25% de los casos se podría prevenir, mientras que el 70% de las personas con epilepsia podrían controlar las crisis si recibieran el tratamiento adecuado [1, 2].

El Programa de Epilepsia del Ministerio de Salud estima que un 1% de la población chilena padece de esta neuropatología, es decir, 10.8 a 17 pacientes por cada 1000 habitantes (~180 mil personas) e incidencia de 114 por 100 mil habitantes por año [3]. A nivel mundial su prevalencia se estima en más de 50 millones de personas afectadas e incidencia de 2.4 millones de casos diagnosticados anualmente. De estos casos, los trastornos epilépticos parciales representan el 60%. Corresponden a crisis cuya actividad eléctrica anómala permanece limitada a una zona del cerebro, pero que pueden llegar a propagarse por todo el tejido. Este tipo de epilepsia se desencadena por una lesión cerebral que pudo ocurrir muchos años antes, por ejemplo, por una encefalitis, convulsiones febriles o *status epilepticus* (SE), siendo la TLE el tipo más frecuente en adultos [4, 5].

En la TLE el hipocampo es la región más gravemente afectada, pero también puede incluir subregiones de la amígdala y la corteza entorrinal [6]. Se caracteriza por la pérdida neuronal, crecimiento axonal y dendrítico, y dispersión de células granulares [7], razón por la cual se ha propuesto aumenta la probabilidad de desarrollar

deficiencias cognitivas y alteraciones del comportamiento en comparación con grupos control sanos [8]. Además, es una de las formas de epilepsia más resistentes a la medicación, lo que se traduce en aproximadamente un tercio de los pacientes diagnosticados [4]. De acuerdo con la *International League Against Epilepsy* (ILAE), los pacientes refractarios corresponden a aquellos que presentan crisis tras el tratamiento con dos fármacos antiepilépticos tolerados, adecuadamente prescritos (ya sea en monoterapia o en terapia combinada) durante un año o en un tiempo inferior a tres veces el intervalo entre crisis que mostraban antes de iniciar la terapia. Para aquellos casos, la remoción quirúrgica del tejido epiléptico es el tratamiento de primera línea, sin embargo, incluso en países desarrollados, la cirugía suele ser subutilizada o aplicada tardíamente [9].

Por otra parte, el impacto de la epilepsia sobre la calidad de vida de los pacientes considera varios aspectos. En primer lugar, los peligros propios de las crisis (posibles lesiones, hospitalización y mortalidad) junto con los efectos secundarios de los tratamientos disponibles (alteraciones de la memoria, concentración, velocidad de procesamiento de la información, tiempo de reacción, etc.) [10]. En segundo lugar, la salud mental, pues la incertidumbre de cuándo ocurrirá una crisis junto con el deterioro neurológico subyacente a la enfermedad a menudo provocan ansiedad y/o depresión que limitan aún más la capacidad funcional de los pacientes, las perspectivas educativas/laborales y la participación social [11]. Por consiguiente, se desprende que la epilepsia es una enfermedad compleja que apoya la necesidad de emplear modelos experimentales de TLE con el objetivo de abordar distintas estrategias asociadas a esta neuropatología, pero también para profundizar en aspectos fundamentales de la estructura y función del sistema nervioso central (SNC).

Modelos animales de epilepsia del lóbulo temporal

No existe un modelo experimental que reproduzca todas las características de la TLE humana [4], sin embargo, debido a que esta neuropatología puede desarrollarse como consecuencia de un daño cerebral, la mayoría de los modelos animales involucran el

uso de procedimientos que reproduzcan este tipo de alteraciones (Fig.1). Por otra parte, el modelo seleccionado debe permitir abordar todas las preguntas propuestas por el investigador, al mismo tiempo de considerar el bienestar de los animales con el objetivo de minimizar su dolor, ansiedad e incomodidad [6].

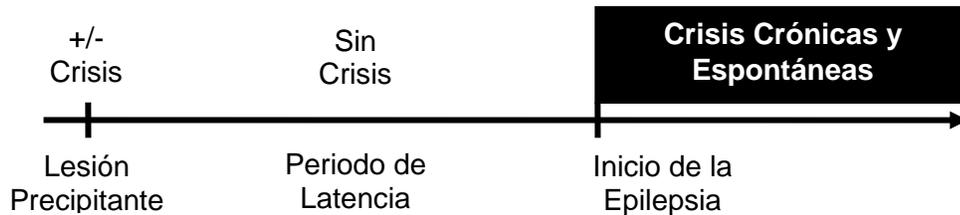


Figura 1: Esquema de la secuencia de eventos en el desarrollo de la TLE.

Modificado de Buckmaster, 2004 [6].

Así, para investigar lesiones que inician la epileptogénesis del lóbulo temporal, son útiles los modelos de hipertermia neonatal, hipoxia-isquemia neonatal y trauma cerebral, sin embargo, estos modelos animales no presentan esclerosis hipocampal y el desarrollo de epilepsia crónica no es consistente en comparación con otros modelos. Además, tienen una morbilidad y mortalidad considerable que los vuelve problemáticos desde una perspectiva bioética [6]. Ahora bien, cuando el proceso epileptogénico es el foco de la investigación (por ejemplo, determinar si una diferencia entre un grupo epiléptico y un grupo control es una causa o un efecto de las crisis, o para comparar la epileptogenicidad entre especies), el modelo de *kindling* es de utilidad. Consiste en la estimulación eléctrica repetitiva y focal en el cerebro que provocan crisis de duración e intensidad crecientes hasta alcanzar una meseta. No obstante, presenta dos desventajas importantes: (1) requiere de mucho tiempo implementarlo para inducir un estado crónico de hiperexcitabilidad y (2) tiene una baja reproducibilidad puesto que la aparición de crisis espontáneas no es un hallazgo universal en todos los laboratorios o especies estudiadas, por lo que su relevancia para la TLE humana es cuestionable [6, 7, 12, 13]. Por otra parte, para comprender los complejos y múltiples efectos que pueden ocasionar las lesiones epileptogénicas, el uso de la toxina tetánica ha sido útil gracias a su mecanismo de acción (bloquear preferentemente la liberación de GABA) pues inclina la balanza a un estado excitatorio que aumenta la probabilidad de generar

crisis, sin embargo, al igual que los modelos previos, no induce esclerosis en el hipocampo ni establece una epilepsia crónica [6]. Finalmente, si la pregunta a resolver guarda relación con: (1) la esclerosis del hipocampo, el período de latencia y la etapa de epilepsia crónica, además de (2) probar tratamientos antiepiléptogénicos y anticonvulsivos, los modelos que inducen un SE por la administración intracerebral o sistémica de ácido kaínico (KA) o pilocarpina son la primera opción [4-6, 14].

El KA es un análogo cíclico de L-glutamato y un agonista de los receptores GluR5-7, GluK4 y GluK5 [4]. Está ampliamente descrito en la literatura que su administración intrahipocámpal en ratas provoca un cuadro similar a la TLE humana, que comprende: (1) la inducción del SE luego de 5-60 min posterior a la inyección de KA en dosis de 0.4-2.0 μg , (2) un período de latencia que sigue a la lesión precipitante que puede durar días hasta semanas y, (3) la aparición gradual de crisis espontáneas recurrentes que definen la etapa de epilepsia crónica asociada a cambios neuroanatómicos y manifestaciones conductuales [4, 7, 14]. Cabe destacar que la administración sistémica de KA o pilocarpina muestra resultados similares respecto de la injuria cerebral inicial (SE), síntomas conductuales, duración del período de latencia y características electroencefalográficas, sin embargo, presentan como desventaja el daño masivo de estructuras extrahipocámpales y una mayor tasa de mortalidad. Por el contrario, la administración intracerebral provoca una lesión más focal, y en consecuencia, una epilepsia aparentemente más localizada, como se observa en la neuropatología humana de TLE [4]. Es decir, tanto ratas como ratones presentan manifestaciones conductuales que replican muchas características de las crisis en humanos, en cuyo caso dependen del tipo de crisis (focal vs generalizada), la estructura cerebral involucrada y la edad del paciente [15]. En el caso del modelo de TLE por administración sistémica o intracerebral de KA o pilocarpina, no se han observado diferencias importantes en el desarrollo de alteraciones conductuales y electroencefalográficas al utilizar ratas Wistar o de la cepa Sprague-Dawley [16]. Sin embargo, se debe considerar que para los roedores la sensibilidad a los estímulos epileptogénicos y la gravedad de las crisis es mayor durante el desarrollo temprano, en donde las crisis se clasifican en función de sus manifestaciones motoras de acuerdo

a varias escalas que tienen en cuenta los cambios relacionados con la edad en el desarrollo motor y el sitio donde pueden originarse las crisis. Así, los días postnatales (PN) de las ratas 8-10 corresponden aproximadamente a un humano recién nacido de término. Las ratas de 2-3 semanas de edad serían equivalentes a bebés y niños pequeños. Las ratas de 3 a 5 semanas de edad corresponden a niños pre púberes, mientras que alrededor del día P32-38 y P28-36 comienza la pubertad de las ratas machos y hembras, respectivamente, siendo adultas después del día P55 [15]. No obstante, se debe tener en consideración que los tratamientos que funcionan en adultos pueden simplemente no funcionar en niños, es decir, el parangón entre la edad de las ratas y los resultados promisorios sobre la prueba de fármacos anticonvulsivos en modelos de epilepsia no son garantes de efectividad en humanos, especialmente en pacientes pediátricos, en donde la farmacología de un medicamento anticonvulsivo aprobado no está validada en esta población de pacientes antes de que la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) lo apruebe para las epilepsias focales. Por otra parte, si bien es cierto se han realizado avances respecto de modelos que representan uno o más tipos de epilepsias genéticas, lo cierto es que la población de pacientes pediátricos requiere incluso mayor atención que la adulta, pues la actividad epileptica crónica tiene mayor potencial de provocar efectos adversos en cerebros en desarrollo y, por lo tanto, sus consecuencias pueden ser catastróficas sobre la calidad de vida de los pacientes [17].

Rol de los canales de sodio dependientes de voltaje en la epilepsia

Debido a que las crisis pueden ser causadas por múltiples mecanismos, se recomienda estudiar la epilepsia de acuerdo a posibles anomalías relacionadas con: (1) la base eléctrica del potencial de membrana y el potencial de acción, (2) la transmisión sináptica y (3) la plasticidad; en otras palabras, todos los niveles de funcionamiento de la comunicación neuronal en el SNC [1]. Al respecto, los canales de sodio dependientes de voltaje (Navs), responsables de la fase despolarizante del potencial de acción en neuronas y otras células excitables [18], tendrían un papel importante en la fisiopatología de la epilepsia tanto hereditaria como adquirida [19].

Estos canales (Fig.2) están formados por una subunidad α de ~260 kDa que contiene al poro de selectividad y que, además, es suficiente para su expresión funcional; asociada a las subunidades auxiliares $\beta 1$ (o $\beta 3$) y $\beta 2$ en el SNC adulto, que modifican su cinética y dependencia al voltaje para su activación [18, 20, 21]. Se han clonado nueve subtipos (Nav1.1 al Nav1.9), siendo los Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 y Nav1.6 los principales expresados en el SNC y de los cuales se han encontrado concentraciones alteradas de mRNA y proteínas para las subunidades α y β tanto en animales como en pacientes con epilepsia adquirida [19, 21]. Además, a pesar que su identidad de secuencia aminoacídica es >70%, el *knockout* de cualquiera de los genes *SCN1A*, *SCN2A* y *SCN8A* (que codifican para las subunidades α de los Nav1.1, Nav1.2 y Nav1.6, respectivamente) es letal, demostrando que cada canal tiene una función esencial no redundante [22].

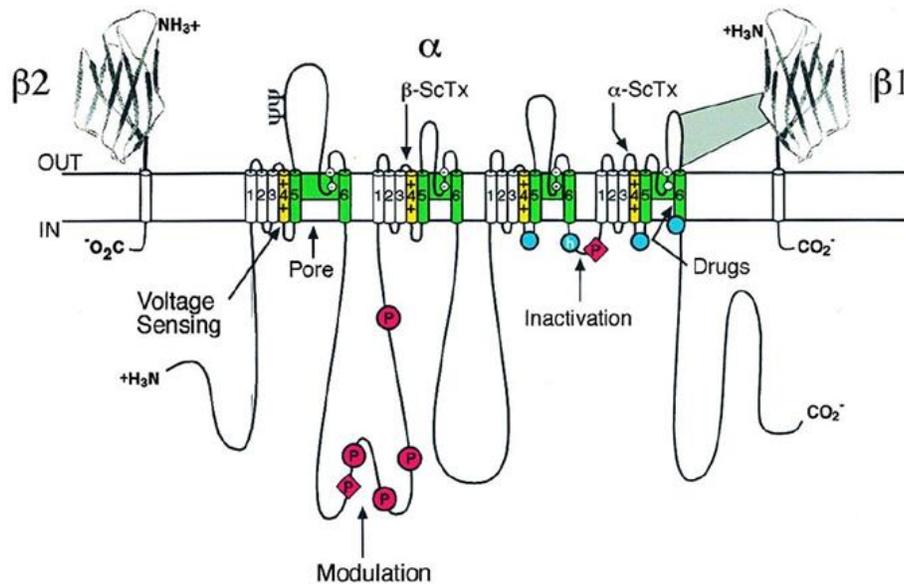


Figura 2: Estructura primaria de las subunidades α y β de los Navs [18].

Durante el período de latencia de la epileptogénesis ocurren cambios moleculares y celulares que dan como resultado un aumento neto en la excitación de la red neuronal, pero que es reducida, por ejemplo, mediante el bloqueo selectivo de las corrientes asociadas al canal Nav1.6 utilizando 4,9-anhidro-tetrodotoxina (4,9-ah-TTX) [23];

razón por la cual surge como un blanco terapéutico para el tratamiento de la epilepsia refractaria, especialmente cuando evidencia reciente demuestra que la reducción de la expresión de *SCN8A* en el hipocampo elimina de manera efectiva el desarrollo de crisis espontáneas, mitiga la hiperactividad inducida por KA y disminuye la gliosis reactiva en un modelo de TLE [24]. La fenitoína y carbamazepina junto con medicamentos más nuevos como lamotrigina, felbamato, topiramato, oxcarbazepina, zonisamida, rufinamida, lacosamida y acetato de eslicarbazepina son bloqueadores de Navs. Estos fármacos tienen la mayor afinidad por el canal en su estado inactivo, ralentizando el proceso de reciclaje conformacional hacia el estado cerrado. El ejemplo clásico es la fenitoína, donde la afinidad por el canal es dependiente del voltaje y de la frecuencia; es decir, a potenciales hiperpolarizantes (cuando el canal permanece cerrado) la afinidad de este fármaco por los Navs es baja; mientras que en un rango de -80 a -30 mV la afinidad aumenta linealmente, por lo que se une a los Navs preferentemente en los estados activado e inactivado. De esta manera reduce la disponibilidad de canales para un próximo tren de despolarizaciones, cuya frecuencia se ve aumentada en un cerebro epiléptico. Cabe señalar que este mecanismo de acción es equivalente para más de la mitad de los fármacos que tienen a los Navs como blanco terapéutico [25].

A la fecha, sin embargo, no existen compuestos farmacológicos que puedan dirigirse selectivamente a un único subtipo de Nav [24, 26]. No obstante, está descrito que algunas ficotoxinas muestran afinidad diferencial entre isoformas, en donde las moléculas pequeñas probablemente ofrecen la mejor posibilidad de lograr mayor selectividad, lo que en suma las vuelve herramientas útiles para estudiar la estructura y función de estos canales [27].

Neosaxitoxina como potencial fármaco antiepiléptico

Las ficotoxinas son producidas por microalgas (de ambiente marino y dulceacuícolas) como metabolitos secundarios, pero que están presentes en grupos taxonómicos restringidos [28]. En el mar estas toxinas son acumuladas por bivalvos filtradores y

luego incorporadas a sus depredadores, vale decir, todo tipo de gastrópodo carnívoro. En consecuencia, cuando los humanos consumen mariscos, se intoxican [29].

Las Toxinas del Veneno Paralizante de Marisco representan una amenaza grave para la salud pública debido a su alta tasa de mortalidad en mamíferos, siendo la parálisis aguda el síntoma clínico primario [30]. Forman un grupo de más de 28 ficotoxinas de naturaleza no proteica, con un esqueleto químico común (3, 4, 6-trialquil tetrahidropurina), además son totalmente solubles en agua (Fig.3) [31]. Su peso molecular es bajo, varía entre los 280 a 450 Da, y si bien la saxitoxina (STX) fue la primera descrita y más estudiada [32, 33], su análogo NeoSTX, cuya única diferencia con STX es la presencia de un grupo hidroxilo en la posición N1 del grupo guanidino (N1-OH) [34, 35], es la más potente de acuerdo con estudios realizados *in vitro* e *in vivo* (NeoSTX > STX > TTX) [36, 37]. La alta toxicidad de estas ficotoxinas se debe a su unión reversible al sitio 1 de la subunidad α de los Navs, bloqueando la entrada de iones Na^+ y, consecuentemente, la transmisión neuronal al evitar que las células nerviosas y musculares produzcan potenciales de acción. De esta manera causan la muerte de mamíferos por paro respiratorio y shock cardiovascular [28].

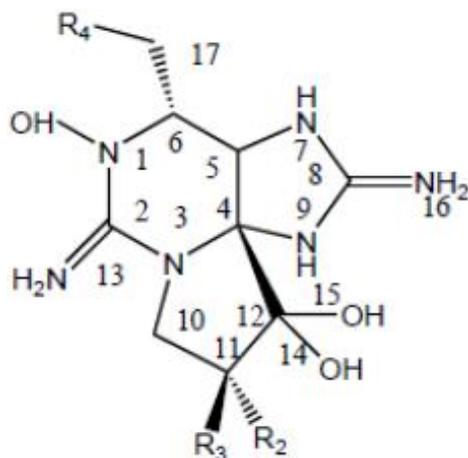


Figura 3: Estructura molecular de NeoSTX. Modificado de Cusick y Saylor, 2013 [38].

La aplicación local de NeoSTX ha sido utilizada en varios ensayos clínicos para controlar tanto el dolor (actividad anestésica) como la hiperactividad muscular (efecto relajante) [28, 39-41], sin embargo, no fue sino hasta 2018 que se publicó por primera

vez su infusión en el SNC. Galindo et al. [37] demostró que la inyección bilateral de 10 ng/ μ L de NeoSTX en la región CA3 del hipocampo dorsal bloquea los potenciales de acción por 48 h y que la recuperación de la inactivación comienza aproximadamente 3 días después. Este efecto de larga duración junto con la propagación restringida al sitio de inyección puede explicarse por el bajo IC₅₀ de 3.5 nM que tiene esta ficotoxina para bloquear los Navs [42]. Por otra parte, la administración de NeoSTX no provocó daño, siendo equivalente a la infusión de suero salino utilizado como control; antecedentes que respaldan su uso para el tratamiento de patologías que se caracterizan por una excitabilidad neuronal anómala, como es el caso de la epilepsia; más aún cuando a diferencia de otros bloqueadores de Navs, esta ficotoxina tiene un efecto de larga duración, reversible y no neurotóxico [37].

Muchos fármacos antiepilépticos comunes ejercen su acción en el SNC al apuntar a la función de los Navs [43]. Su objetivo principal, válido también para aquellos fármacos con otros blancos terapéuticos, tales como aquellos que afectan la transmisión GABAérgica cerebral (barbitúricos, benzodiazepinas), es el control eficaz de las crisis a largo plazo. Además, deben mostrar un perfil de seguridad y tolerabilidad favorables, un amplio espectro de actividad y una farmacocinética estable y predecible, que incluye la absorción rápida después de la administración oral y la penetración en el SNC, sin interactuar con otros medicamentos u otros fármacos antiepilépticos [44]. La NeoSTX, sin embargo, no puede atravesar la barrera hematoencefálica, a no ser que haya altos niveles de toxina a nivel sanguíneo [28, 45]. Si bien este antecedente pareciera restarle mérito como potencial fármaco, lo cierto es que hay un creciente interés por tratamientos localizados que enfoquen la terapia precisamente en la región del cerebro afectada con el objetivo de reducir los efectos secundarios inherentes a los tratamientos sistémicos. Proctor et al. [46] desarrolló un dispositivo capaz de detectar la actividad neuropatológica y luego intervenir para detener las crisis mediante la entrega de neurotransmisores inhibitorios directamente en la fuente de las mismas en un modelo de epilepsia. Mismo principio aprobado para el primer ensayo clínico mundial que administrará valproato directamente en el cerebro de pacientes con epilepsia refractaria en Melbourne, Australia ([NCT02899611](#)).

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el posible efecto antiepileptogénico y anticonvulsivante de NeoSTX en el modelo animal de TLE inducida por la administración intrahipocampal de ácido kaínico, al reducir la actividad eléctrica hipocampal en el foco epiléptico, junto con evaluar su capacidad para prevenir la gliosis reactiva y proteger del deterioro cognitivo característico de este modelo.

HIPÓTESIS

La NeoSTX, inactiva de forma reversible y no neurotóxica la actividad hipocampal, disminuyendo la frecuencia de crisis, previniendo el daño neuronal y deterioro cognitivo inducido en un modelo animal de TLE.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antiepiléptico, antiepileptogénico y neuroprotector sobre la pérdida neuronal y daño cognitivo de la administración de NeoSTX en un modelo animal de TLE.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OE-1. Determinar si NeoSTX previene o retrasa el desarrollo de crisis espontáneas cuando es administrada durante la epileptogénesis.

OE-2. Determinar si NeoSTX posee un efecto anticonvulsivante durante la etapa de epilepsia crónica.

OE-3 Evaluar el efecto de la administración de NeoSTX durante la epileptogénesis y en epilepsia crónica sobre la incidencia de eventos oscilatorios de alta frecuencia mediante registros electrofisiológicos *in vivo*.

OE-4. Determinar si NeoSTX administrada durante la epileptogénesis o durante la etapa de epilepsia crónica previene o restringe, respectivamente, la gliosis reactiva característica del modelo de TLE.

OE-5. Determinar si NeoSTX administrada durante la epileptogénesis o durante la etapa de epilepsia crónica previene el deterioro en el desempeño de la memoria dependiente de hipocampo en un modelo de TLE.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Para este estudio se utilizaron 16 ratas adultas macho de la cepa Sprague-Dawley, de un peso entre 270-310 g, obtenidas del bioterio central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Las ratas fueron mantenidas individualmente, con acceso libre a agua y alimento, en sala acondicionada a 23°C y ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h, ZT0 = 6 am. Todos los procedimientos quirúrgicos y experimentales se realizaron de acuerdo al *National Institute of Health (USA) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23, revised 1996)*, bajo la aprobación del comité de bioética de nuestra institución (CBA# 1102, FMUCH).

Toxina

NeoSTX fue obtenida del Laboratorio Bioquímica de Membrana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Su purificación y cuantificación mediante HPLC-FLD se realizó de acuerdo a protocolos previamente descritos y validados [31, 34].

Implante bilateral crónico de electrodos-cánula para registros de LFP y administración de fármacos

Para inducir epilepsia, administrar NeoSTX y registrar la actividad eléctrica del hipocampo, los animales fueron anestesiados con isoflurano (2.5% para inducción y 1.5% para mantención en oxígeno con un flujo de 1 L/min) y dispuestos en un aparato estereotáxico. Un electrodo-cánula de acero inoxidable (21G; Plastic one) fue implantado en cada hipocampo en la región ventral, orientado hacia el giro dentado, cuyas coordenadas son: AP -6.3 mm desde bregma; lateralidad ± 4.2 mm y profundidad de 4.6 mm desde la superficie craneal (cánula guía de 2.2 mm acoplada a dos electrodos 2.4 mm más largos) de acuerdo con el atlas del cerebro de la rata de Paxinos y Watson (Fig.4) [47]. Ambos implantes se fijaron al cráneo con tornillos de

anclaje de acero inoxidable y acrílico dental. Se administró el antibiótico Enrofloxacinó al 5% (19 mg/Kg i.p.) y el antiinflamatorio Ketoprofeno al 0,4% (2 mg/Kg solución oral) al final de la cirugía y por tres días consecutivos. Los animales tuvieron 7 días de recuperación antes de realizar cualquier otro procedimiento experimental.

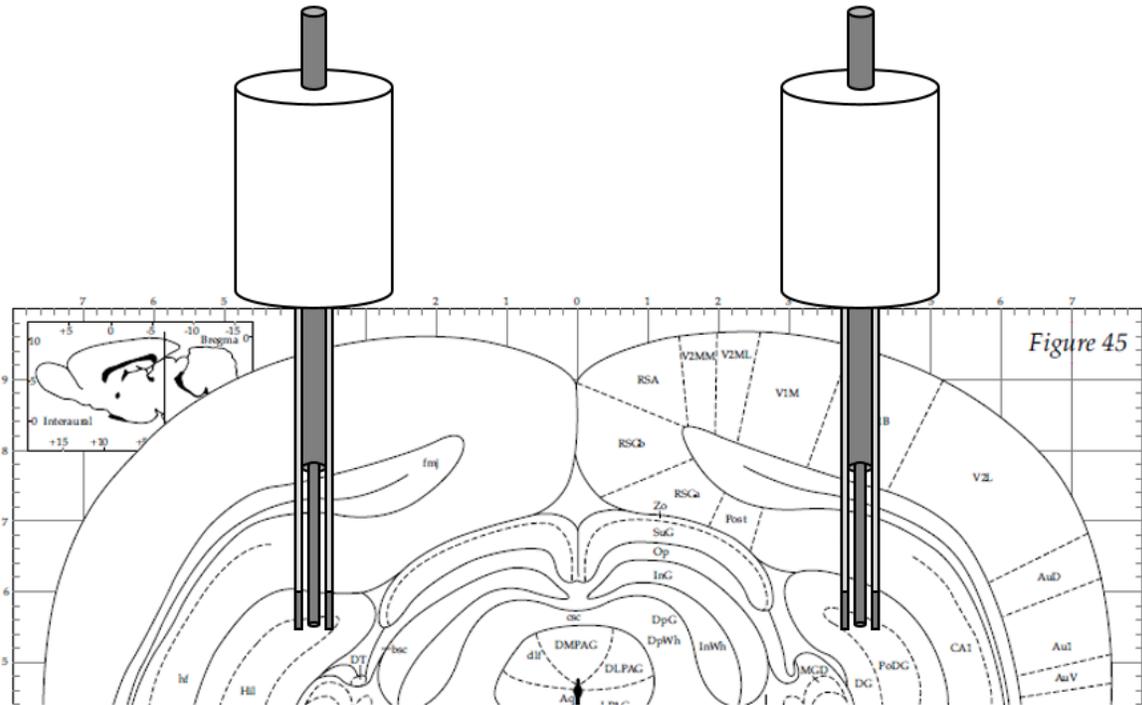


Figura 4: Diagrama del implante bilateral crónico de cánulas (guía e inyección) más dos electrodos de registro en la región del giro dentado. Modificado desde Paxinos y Watson, 1998 [47].

Inducción del SE mediante inyección intrahipocampal de ácido kaínico

Todos los animales fueron anestesiados con isofluorano al 1.5% en oxígeno con un flujo de 1 L/min y recibieron una inyección de KA (SigmaAldrich) de 0.4 μ g en 0.5 μ L de solución salina por hipocampo a las 9 am, procedimiento realizado en el designado “día 0” (d0) (Fig.5). Para ello se utilizó una jeringa Hamilton de 10 μ L acoplada a una cánula de inyección de 33G. La aguja se insertó en la cánula guía y se inyectó manualmente 0.1 μ L cada 60 s. Antes de retirar la aguja se esperó 5 min para prevenir la pérdida de fluido por capilaridad. El SE fue monitoreado y grabado con una cámara en posición cenital durante 4 h por animal.

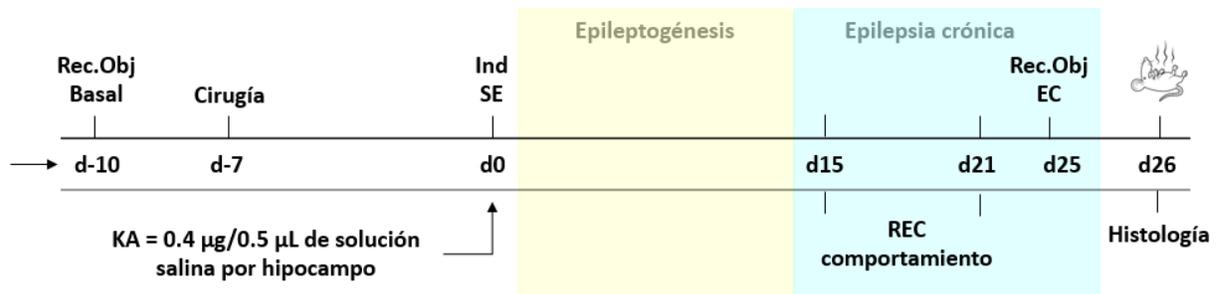


Figura 5: Procedimientos comunes para todos los grupos experimentales. Donde REC = grabación del comportamiento de los animales y Rec.Obj = Tarea de reconocimiento espacial de objetos.

Registros de LFP y administración de NeoSTX

Dos electrodos monopolares de acero inoxidable de 0.003” con aislamiento de teflón (diámetro total 0.0055”) fueron pegados con cianoacrilato a una cánula guía e insertados bilateralmente a la misma profundidad alcanzada por las cánulas de inyección (4,6 mm desde la superficie craneal; ver coordenadas estereotáxicas). Un alambre de las mismas características fue soldado a un tornillo de acero inoxidable y fijado al cráneo sobre el cerebelo para ser utilizado como electrodo de referencia (Fig.6). Los registros de LFP se realizaron con un Sistema Cheetah de 32 canales analógico (Neuralynx) cuyos datos fueron adquiridos y digitalizados a 2 kHz, filtrados entre 0.1-6000 Hz (para banda completa) y entre 100-250 Hz (para altas frecuencias).

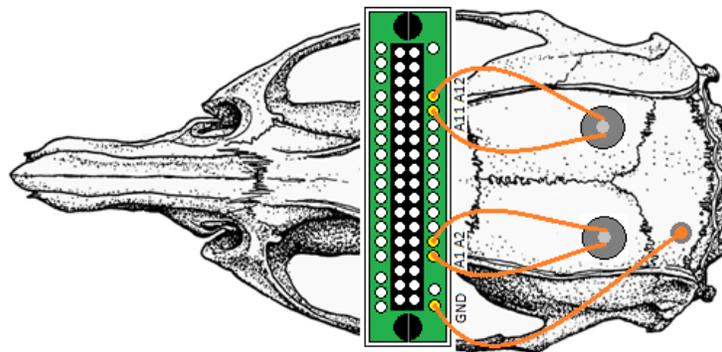
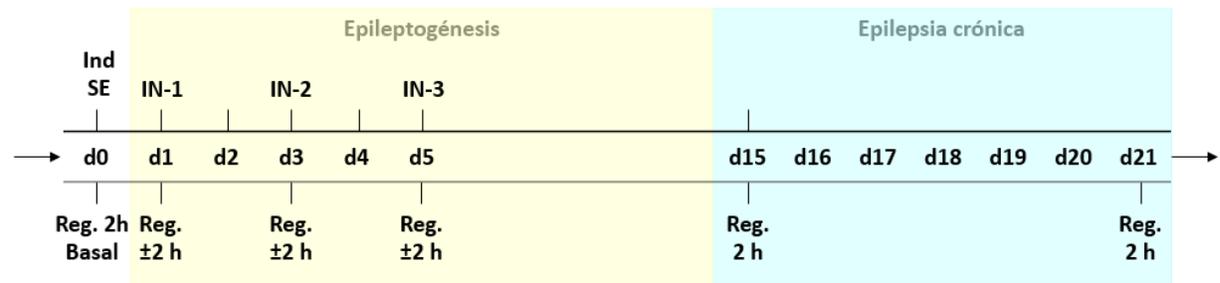


Figura 6: Esquema de los electrodos conectados a la pc-board para registro de LFP. Modificado de Paxinos y Watson, 1998 [47].

Posterior a la inducción del SE las ratas se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales: (1) animales inyectados bilateralmente con NeoSTX durante la epileptogénesis (inicio a las 24 h después del SE; grupo SE-N, n=4), (2) animales tratados durante la etapa de epilepsia crónica (15 días después del SE; grupo EC-N, n=4); siempre con 0.5 μ L de 10 ng/ μ L de NeoSTX (tres veces durante una semana), y los respectivos grupos control en donde se administró un volumen equivalente de solución salina (grupos 2 y 3, SE-S y EC-S, respectivamente, con n=4 cada uno) (Fig.7). La inyección de NeoSTX o salino se realizó a las 9 am mediante la misma técnica empleada para inducir el SE con KA; además previa inducción del SE, y antes y después de los tratamientos, se registró el potencial de campo local (LFP) de todas las ratas por 2 h. Adicionalmente, aquellos animales tratados durante la epileptogénesis (grupos SE-S y SE-N) fueron registrados en el día 15 y 21 postSE.

A



B

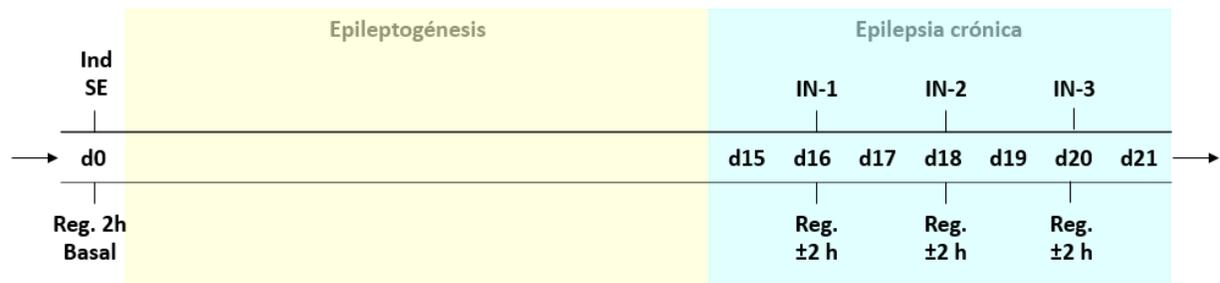


Figura 7: (A) Procedimientos y régimen de inyecciones para grupos tratados durante la epileptogénesis. (B) Procedimientos y régimen de inyecciones para grupos tratados

durante la etapa de epilepsia crónica. Donde Ind SE = Inducción del *status epilepticus*; Reg. = Registro de actividad eléctrica hipocampal; IN = Número de inyección.

Observación conductual en la etapa de epilepsia crónica

Quince días después de la inducción del SE, al momento de la etapa de epilepsia crónica, se grabó y monitoreó el comportamiento de 4 ratas en paralelo (Fig.8) con una cámara digital en posición cenital por 2 h diarias, entre las 4 y 6 pm, próximo al cambio al ciclo de oscuridad, para favorecer la ocurrencia de crisis ictales asociadas al sueño REM y vigilia que involucrarían múltiples áreas del circuito entorrinal-hipocampal y que, de acuerdo a Bragin et al. [14] afectaría también regiones extrahipocampales con conexiones más directas al sistema motor, de manera de evaluar el número de crisis de acuerdo con la clasificación de Racine de cinco etapas: (1) inmovilidad seguida de clonus facial, (2) movimientos masticatorios y cabeceo, (3) sacudidas o clonus de extremidades anteriores unilateral o bilateral, (4) *rearing* y (5) *rearing* más caída [4, 14, 48]. Se consideraron en los resultados aquellas crisis que iban desde la etapa 3 a 5.

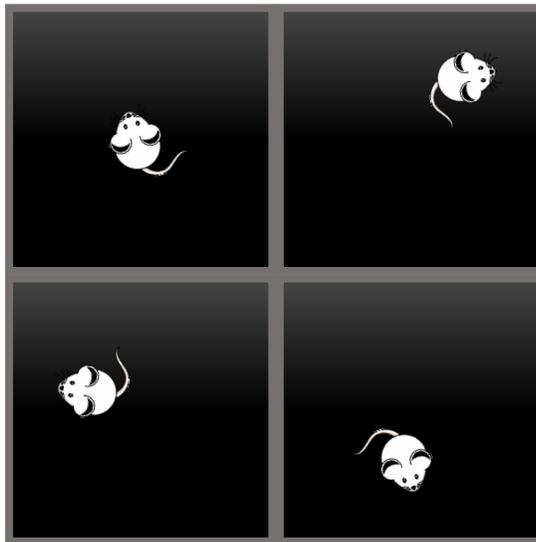


Figura 8: La arena de pruebas consistió en una caja de 80x80x80 cm dividida en 4 partes iguales con separaciones de policarbonato de color negro de manera de analizar en paralelo el comportamiento de los animales.

Tarea conductual de reconocimiento espacial de objetos

Para evaluar la capacidad de memoria espacial dependiente de hipocampo, las ratas fueron sometidas a una tarea de reconocimiento de objetos en la modalidad “*in place*” previa a la inducción del SE y en la etapa de epilepsia crónica [49]. La arena de pruebas consistió en una caja de 80x80x80 cm a la que las ratas fueron habituadas por 15 min tres días consecutivos para prevenir cualquier comportamiento ansiogénico ante la exposición a un nuevo entorno. Posteriormente, los animales fueron expuestos a la arena con dos objetos idénticos (A1 y A2), permitiéndoles explorarlos libremente por 5 min. A las 24 h los animales se volvieron a exponer a la arena durante otros 5 min, con uno de los objetos en una nueva posición (A1 y A2') (Fig.9). El tiempo de exploración del objeto ubicado en una nueva posición con respecto al tiempo total de exploración de ambos objetos se usó como indicador de memoria. Todo el comportamiento de los animales fue grabado con una cámara digital en posición cenital; videos analizados con una rutina construida con el software MATLAB (Mathworks, Inc.).

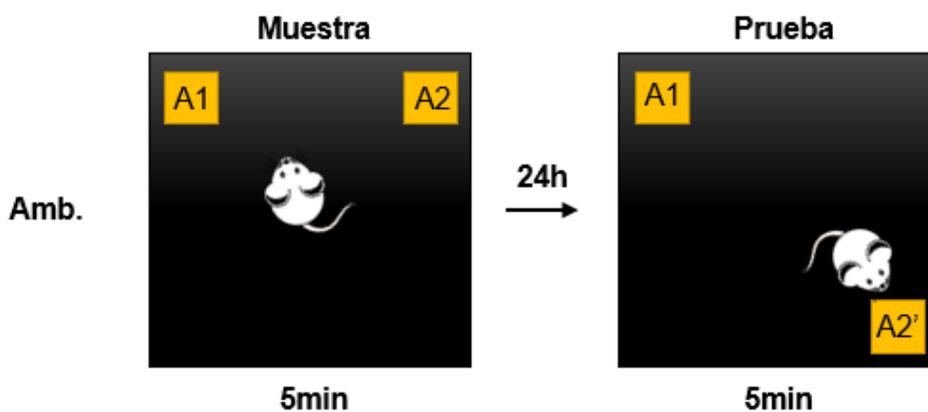


Figura 9: Tarea conductual de reconocimiento espacial de objetos. Modificado de Barker y Warburton, 2011 [49].

Perfusión de animales

Las ratas fueron anestesiadas profundamente con isoflurano al 3% en oxígeno con un flujo de 1 L/min y perfundidas transcárdialmente con 300 mL de solución salina

(0.9% NaCl) y 350 mL de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato (PB 0.1M pH 7.4). Posteriormente los cerebros fueron removidos y post-fijados por 2 horas en solución de fijación y criopreservados en una solución de sacarosa al 30% más azida de sodio 0.02% en PBS. Luego de 2 días los cerebros se cortaron en rebanadas coronales de 50 μm de espesor con un micrótomo de congelación. Los cortes fueron separados intercaladamente y divididos en dos grupos: (1) cortes sometidos a tinción de Nissl para verificar la posición de las cánulas-electrodo y (2) cortes a los que se les realizó inmunohistoquímica para determinar grado de astrogliosis.

Tinción de Nissl

Los cortes de cerebro fueron montados en portaobjetos gelatinizados, dejándose secar por 3 días a temperatura ambiente. Luego fueron deshidratados y rehidratados mediante su inmersión por 1 min en las siguientes soluciones: etanol 70%, 95% y 100%, xilol, alcohol 100%, 95% y 70%, 5 min en agua destilada y 20 min en solución de cressil violeta en buffer acetato-ácido acético. Posteriormente, los cortes fueron sumergidos en cloroformo por 30 s, seguido de las siguientes soluciones por 1 min cada una: etanol 95%, 2 veces en etanol 100% y 2 veces en xilol. Como último paso los cortes fueron cubiertos con un cubreobjetos y solución de montaje (entellan) para su posterior observación al microscopio.

Inmunohistoquímica de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

Los cortes de cerebro fueron lavados por 20 min en PBS y luego incubados en una solución 0.3% H_2O_2 en PBS 0.01M por 30 min para bloquear la peroxidasa endógena. Luego los cortes se lavaron por 20 min en PBS y fueron transferidos a una solución de bloqueo (0.4% Triton-X100, 0.02% azida de sodio y 3% de suero normal de cabra en PBS) por 1 h. Posteriormente, los cortes de cerebro se incubaron *overnight* a 4°C con el anticuerpo primario policlonal anti-GFAP hecho en conejo (Z0334, Dako) diluido en 1:10000 en solución de bloqueo. Los cortes nuevamente se lavaron en PBS por 1 h antes de ser incubados con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo biotinilado

hecho en cabra (Biotin-SP-conjugated AffiniPure, Jackson ImmunoResearch; diluido 1:1000 en 0.4% Triton-X100 más 1.5% de suero normal de cabra en PBS) [37]. Los cortes se lavaron por 40 min en PBS para luego ser incubados por 1 h en solución de avidina-biotina (Vectastain ABC Elite kit, Vector Laboratories) diluido 1:500 en PBS, lavados por otros 30 min e incubados en solución 0.05% clorhidrato de 3-3'-diaminobenzidina que contiene 0.003% H₂O₂ por 8 min. Finalmente, para detener la reacción, los cortes se lavaron con PBS por 20 min. Luego fueron deshidratados, montados con entellan y cubiertos con un cubreobjetos para ser observados al microscopio.

Análisis estadístico

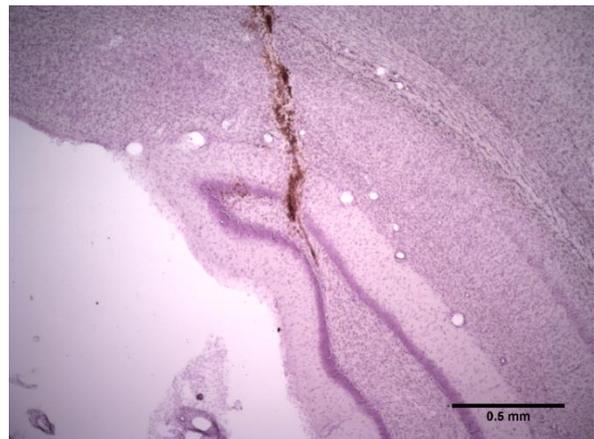
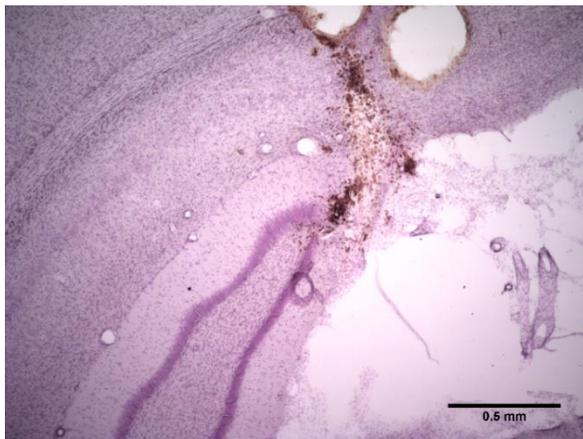
El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism versión 7.04. Los datos conductuales, electrofisiológicos e histológicos se analizaron mediante pruebas no paramétricas no pareadas: Kruskal-Wallis seguido del test de comparaciones múltiples de Dunn o comparaciones por pares (prueba de Mann-Whitney) cuando corresponde. Los datos se presentan como la media \pm error estándar y el nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$.

RESULTADOS

Inducción del *status epilepticus* por la administración bilateral intrahipocámpal de ácido kaínico

Dieciséis ratas adultas macho de la cepa Sprague-Dawley recibieron bilateralmente una inyección de KA 0.4 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{L}$ en solución salina, en la región ventral del hipocampo en el giro dentado para inducir el SE e implementar el modelo de TLE; procedimiento realizado una semana después de la cirugía de implante de cánulas-electrodos. En 18.62 ± 0.50 min las ratas comenzaron a mostrar signos del SE: inmovilidad, salivación y clonus facial que incluyó masticación rítmica, parpadeo y cabeceo (asentimiento), además de movimientos tipo sacudidas (los más frecuentes), junto con rearing asociado a caídas en la fase aguda. Este comportamiento se extendió por 4 h, sin necesidad de rescate. Posteriormente y por tres días promedio las ratas se mostraron irritables e inquietas y disminuyeron su consumo de comida evidenciado en una leve pérdida de peso, no obstante, todas las ratas sobrevivieron al SE. Finalmente, se hizo una reconstrucción de todas las cánulas-electrodos y se confirmó su correcto posicionamiento mediante inspección histológica de la tinción de Nissl para todos los animales (Fig.10).

A



B

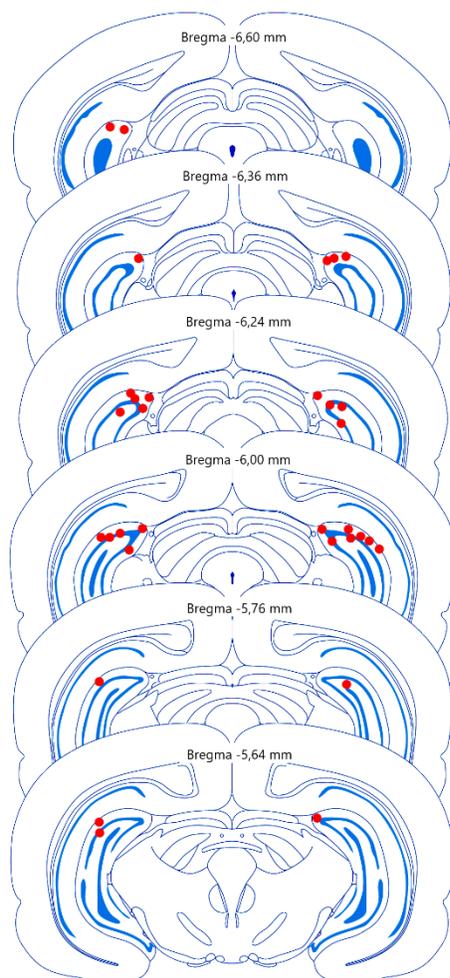


Figura 10: (A) Fotomicrografías de la tinción de Nissl (se observa el posicionamiento de la cánula de inyección para un mismo ejemplar en el hipocampo izquierdo y derecho, respectivamente). (B) Esquema con la reconstrucción de las cánulas de inyección dirigidas bilateralmente al hipocampo en la región ventral orientado hacia el giro dentado (n=16).

Efecto de la administración de NeoSTX durante la epileptogénesis

Se cuantificaron aquellas crisis correspondientes a la etapa 3 a 5 de la escala de Racine. Para ello los animales fueron grabados en paralelo por 2 h (4-6 pm) durante 7 días continuos (d15 a d21). Las ratas, con un n=4 por grupo, no presentaron diferencias significativas respecto del tratamiento ($p=0.20$, prueba de Mann-Whitney)

con 11.73 ± 1.92 y 17.04 ± 3.05 crisis en promedio para aquellas tratadas con salino (SE-S) y NeoSTX (SE-N), respectivamente (Fig.11).

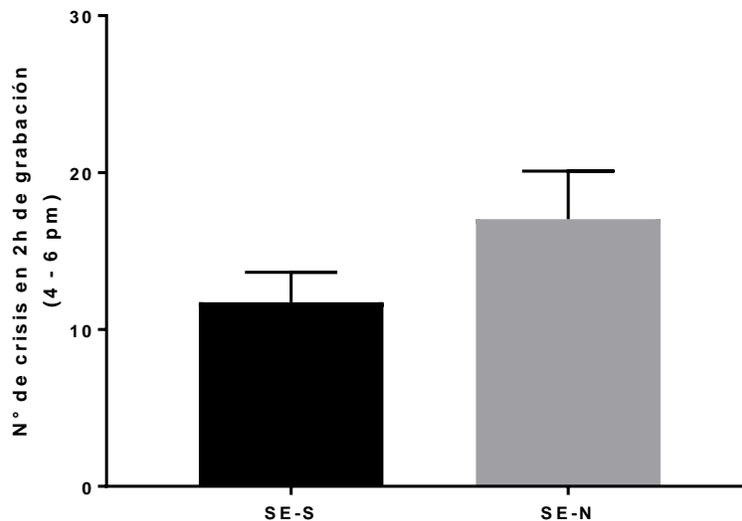


Figura 11: Cuantificación de las crisis para ratas tratadas con salino y NeoSTX (SE-S y SE-N), respectivamente, durante la epileptogénesis.

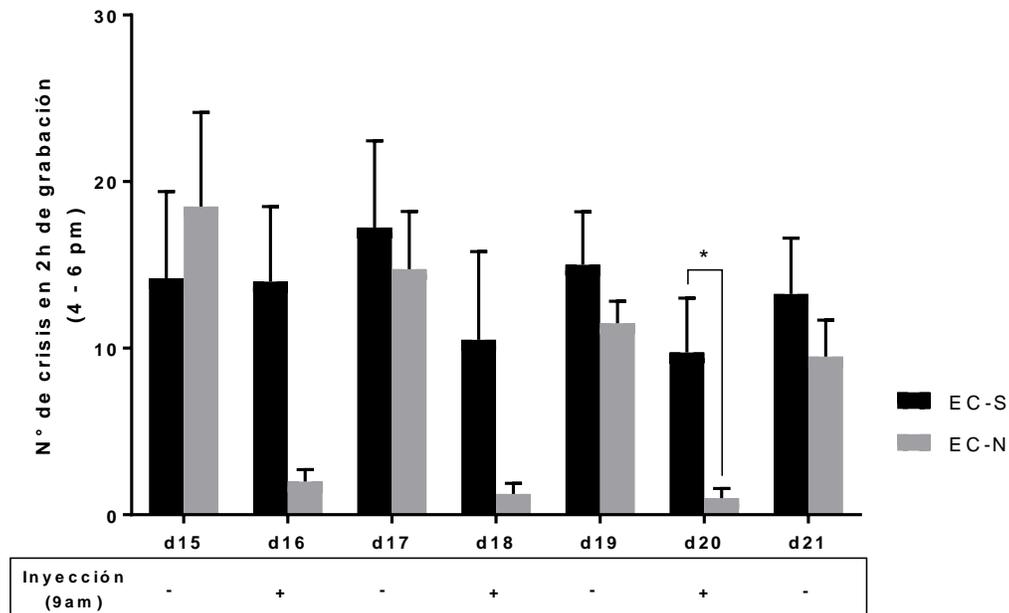
Estos resultados sugieren que el aumento en la actividad eléctrica neuronal como consecuencia de la administración de KA (y que se consolida durante la epileptogénesis), no es revertido por la administración de NeoSTX durante este periodo. Al menos bajo el régimen de inyecciones y concentración utilizada en este trabajo, los animales igualmente desarrollaron la etapa crónica luego de 15 días promedio de latencia, con número de crisis y despliegue comparable con aquellos animales tratados con salino; en consecuencia, NeoSTX no tendría un rol antiepileptogénico.

Efecto de NeoSTX cuando es administrada durante la etapa de epilepsia crónica

Para determinar si NeoSTX disminuye el número de crisis una vez establecida la fase crónica de la TLE, un grupo de ratas fue tratada con NeoSTX o salino los días 16, 18 y 20 después de haber inducido el SE (todas las inyecciones se realizaron a las 9 am). Para la cuantificación de las crisis (consideradas aquellas de etapa 3 a 5 de la escala

de Racine), los animales fueron grabados en paralelo por 2 h (4-6 pm) durante 7 días continuos (d15 a d21). Mediante el test no-paramétrico de Mann-Whitney se comparó la incidencia de las crisis por día entre tratamientos, obteniéndose diferencias significativas en d20 (Fig.12-A).

A



B

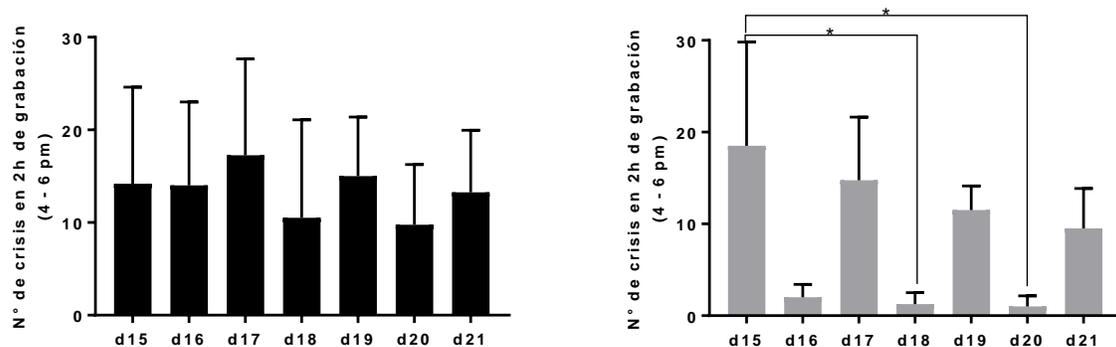


Figura 12: (A) Cuantificación de las crisis para ratas tratadas con salino (EC-S) y NeoSTX (EC-N) durante la etapa de epilepsia crónica. (B) En las gráficas de la izquierda y derecha se muestra el número de crisis por día de acuerdo a cada tratamiento (salino y NeoSTX, respectivamente).

Mediante ANOVAs de rango (Kruskall-Wallis seguido por el post hoc para comparaciones múltiples) no se encontraron diferencias significativas respecto del número de crisis en el periodo observado para la condición salino (Fig.12-B, panel de la izquierda). Por otra parte, los días en que se inyectó NeoSTX el número de crisis disminuyó notablemente, observándose además que estas crisis iban en descenso con las sucesivas inyecciones respecto del nivel basal inicial (Fig.12-B, panel de la derecha), encontrándose diferencias estadísticas entre d15-d18 y d15-d20 de la condición NeoSTX ($p < 0.05$), no obstante, los resultados se obtuvieron con un $n=4$ por grupo, por lo que la dispersión de los datos es un factor a considerar, pero que puede resolverse aumentando el tamaño de la muestra.

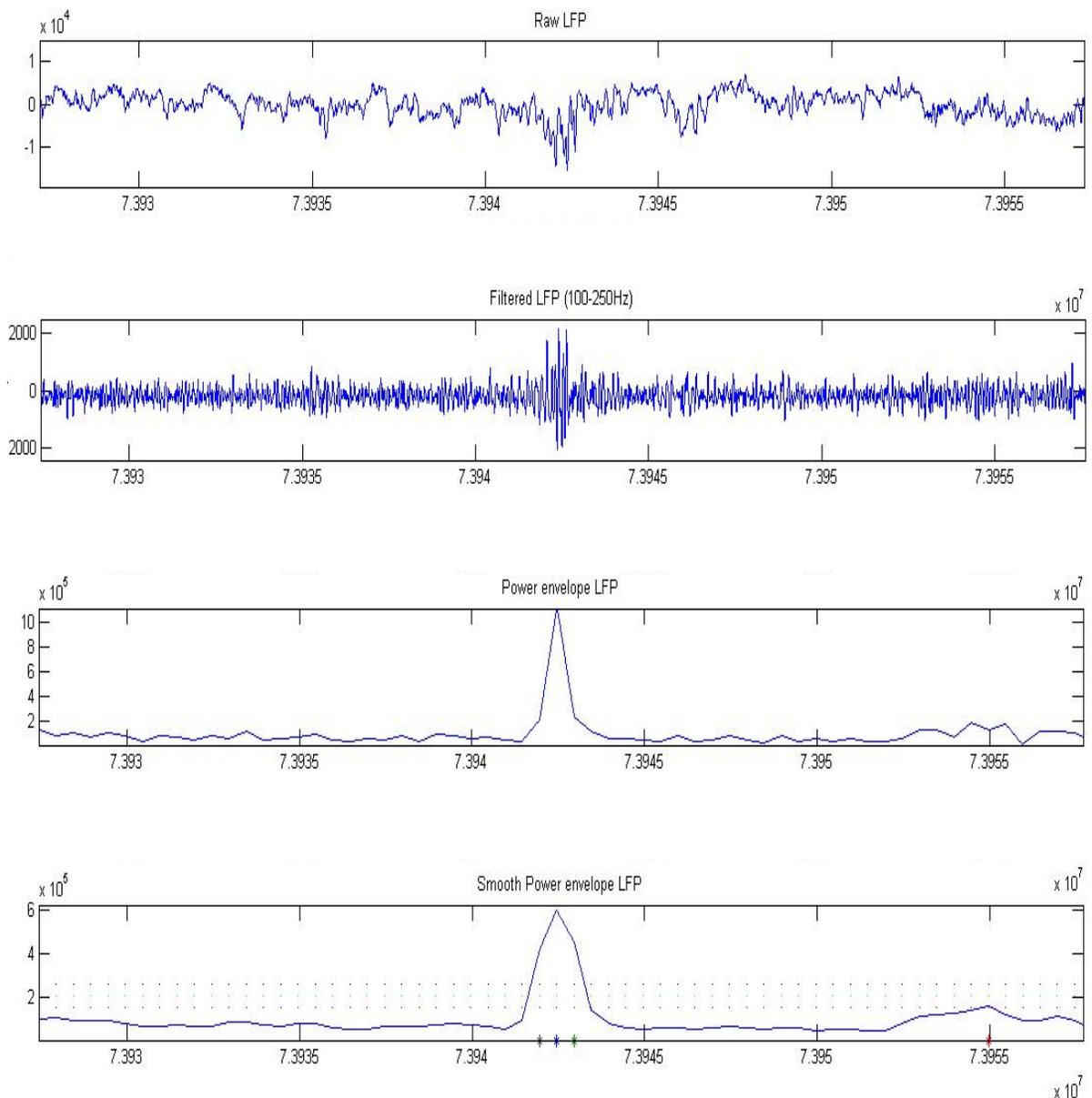
La administración de NeoSTX en etapa crónica disminuyó efectivamente el número de crisis en comparación con el control salino. Si bien las crisis tienden a aumentar nuevamente en aquellos días en que no hubo tratamiento (fenómeno probable para este modelo refractario), interesantemente luego de las sucesivas inyecciones de NeoSTX este valor comienza a disminuir sin superar la incidencia basal. Este resultado sugiere que NeoSTX tendría un gran potencial como fármaco antiepiléptico, controlando el síntoma primario de la epilepsia, pero además abre la posibilidad de analizar qué ocurriría si se aumenta la dosis y/o se extiende el periodo de tratamiento.

Efecto de NeoSTX sobre la incidencia de eventos de alta frecuencia medidos en registros electrofisiológicos *in vivo*.

La actividad eléctrica hipocampal se registró en el hemisferio izquierdo y derecho de todas las ratas (2 señales por hipocampo), despiertas y con movimiento libre. Las señales fueron filtradas entre 0.1-6000 Hz (todo el ancho de banda) y entre 100-250 Hz para mejorar la adquisición de eventos de alta frecuencia del tipo “*ripple*”. Los registros se realizaron un día antes de inducir el SE (basal), dos horas antes y dos horas después de inyectar los animales con NeoSTX o salino (equivalente para todos los grupos experimentales). Adicionalmente, los grupos SE-S y SE-N (tratados durante la epileptogénesis) fueron registrados el día 15 y 21, en etapa de epilepsia crónica.

A través de una rutina de MATLAB (Fig.13-A) se obtuvo el poder de la envolvente de la señal filtrada entre 100-250 Hz, de manera de cuantificar los eventos de alta frecuencia por minuto y compararlos con actividad epileptiforme sobre el registro obtenido en todo el ancho de banda (0.1-6000 Hz) de acuerdo a la descripción dada por Bragin et al. [14] (Fig.13-B) tanto para ratas tratadas durante la epileptogénesis como en etapa de epilepsia crónica.

A



B

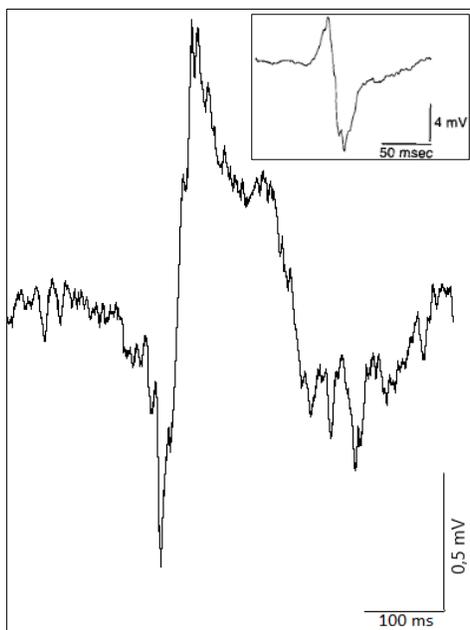
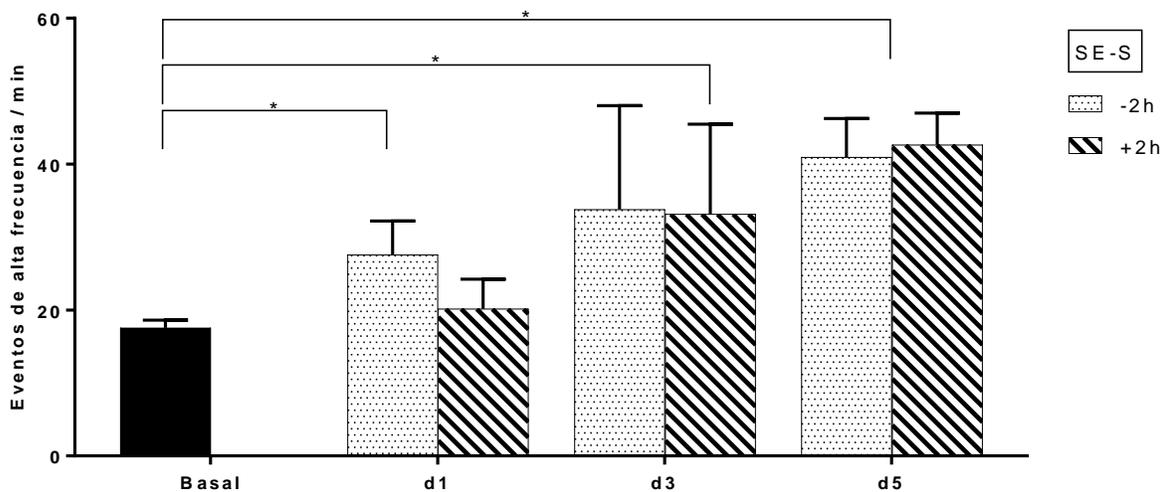


Figura 13: En (A) se muestra en orden descendente el LFP en todo el ancho de banda (0.1-6000 Hz), la señal filtrada (100-250 Hz) y el poder de la envolvente con los umbrales de detección obtenidos mediante MATLAB. El peak corresponde a una oscilación rápida de tipo “*ripple*”. En (B) se muestra un ejemplo de peak interictal de rata correspondiente al grupo SE-S (en inserto peak descrito por Bragin et al.1998).

La incidencia de eventos de alta frecuencia por minuto difiere entre los días de tratamiento, tanto con la administración de salino como de NeoSTX ($p < 0.05$, Prueba de Kruskal-Wallis para ambos casos; $n=4$ por grupo). Veinticuatro horas después de la inducción del SE, se observa que el número de eventos de alta frecuencia por minuto aumenta durante la etapa de epileptogénesis en la semana estudiada respecto del basal ($p < 0.05$ para $d1_{(-2h)}$, $d3_{(+2h)}$ y $d5$ para salino; y $d3_{(-2h)}$ y $d5_{(-2h)}$ para NeoSTX) (Fig.14). Este aumento no se ve alterado por la infusión de salino, es decir, no hay cambios significativos antes o después de su administración por día de tratamiento ni entre los días $d1$, $d3$ y $d5$ ($p > 0.05$) (Fig.14-A) y; si bien tampoco se determinaron diferencias estadísticas respecto de la administración de NeoSTX entre el número de eventos de alta frecuencia por minuto antes o después de inyectar la ficotoxina, o entre los días $d1$, $d3$ y $d5$, o entre el basal y la condición post-inyección obtenido a través de

comparaciones por pares ($p > 0.05$. Prueba de Mann-Whitney); se observa que la incidencia de estos eventos disminuye después de la administración de NeoSTX a valores promedio comparables con el basal (Fig.14-B). Su significancia, por lo tanto, queda supeditada a aumentar el n con el objetivo de reducir la dispersión de los datos.

A



B

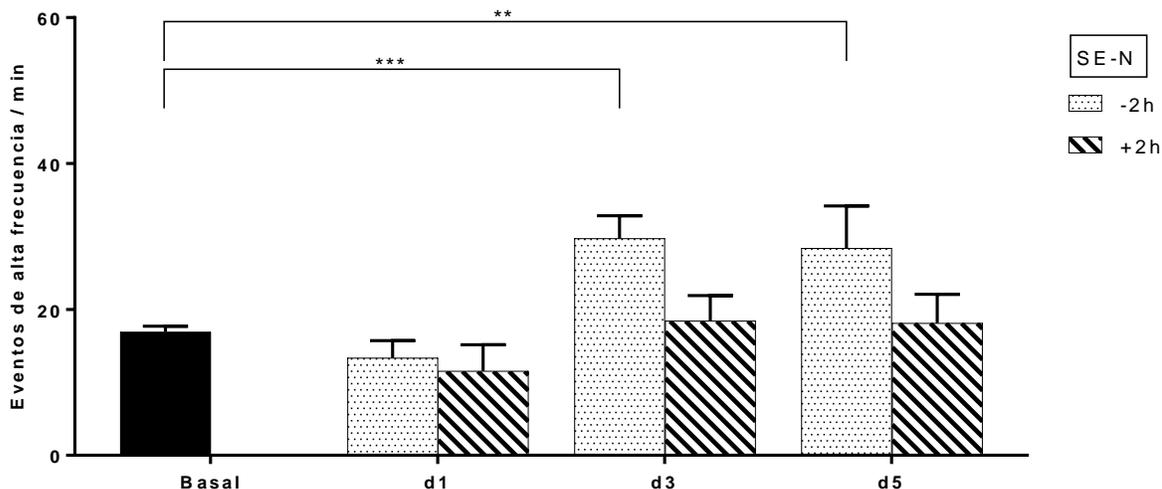


Figura 14: Incidencia de eventos de alta frecuencia por minuto basal (barra negra) y dos horas antes y después de inyectar salino (A) o NeoSTX (B) durante la etapa de epileptogénesis. Resultados para n=4 por grupo.

De los registros previos se evidencia el aumento gradual en la actividad neuronal eléctrica característico de la epileptogénesis. Este incremento fue contrarrestado por la administración de NeoSTX a valores comparables con el basal, sin embargo, finalmente no incidió en que los animales desarrollaran la etapa crónica como quedó demostrado a nivel de comportamiento (Fig.11). Así, a pesar de haber evidencia que respalda que el bloqueo selectivo de las corrientes de Na^+ asociada a los Navs durante la etapa de epileptogénesis impediría el incremento en la hiperexcitabilidad neuronal y, consecuentemente, el desarrollo de crisis espontáneas en el modelo KA-TLE [23, 24], bajo nuestro protocolo de administración de NeoSTX, no se logró detener el establecimiento de la etapa crónica ni disminuir la gravedad de las crisis en comparación con el grupo control.

Con la misma aproximación empleada en los resultados obtenidos durante la epileptogénesis, se evaluó el efecto de la administración de NeoSTX en el modelo de TLE una vez establecida la etapa crónica, es decir, 15 días después de la inducción del SE, respecto de la administración de salino (Fig.15). En este caso, la incidencia de eventos de alta frecuencia por minuto, en la etapa crónica, difiere entre los días de tratamiento cuando se administra tanto salino como NeoSTX ($p < 0.05$, Prueba de Kruskal-Wallis).

Ahora bien, a través de comparaciones por pares se observa que cuando se inyecta salino no hay cambios estadísticamente significativos antes o después de la inyección por día de tratamiento ni entre los días d16, d18 y d20 ($p > 0.05$) (Fig.15-A). Por otra parte, tal como ocurrió cuando se administró NeoSTX durante la epileptogénesis, la incidencia de estos eventos en la etapa crónica disminuyó en los tres registros realizados inmediatamente después de administrar NeoSTX (Fig.15-B), con diferencias significativas ($p < 0.05$) entre d16_(-2h) y d18_(2h) respecto del basal (pero no por día de tratamiento ni entre días). Sin embargo, en los días sucesivos y antes de inyectar, los registros mostraron que los eventos de alta frecuencia por minuto aumentaron, pero sin superar la incidencia previa (pre-inyección).

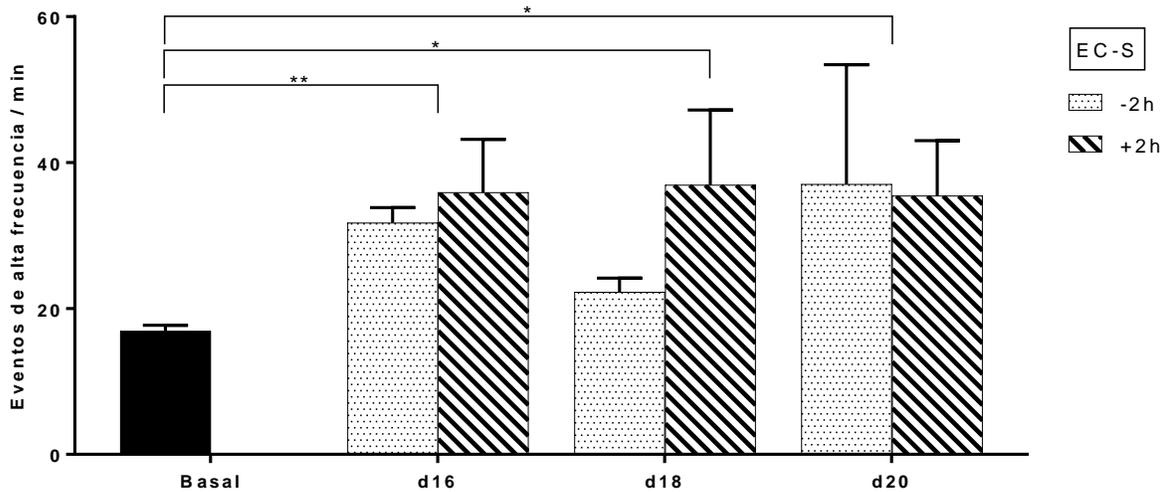
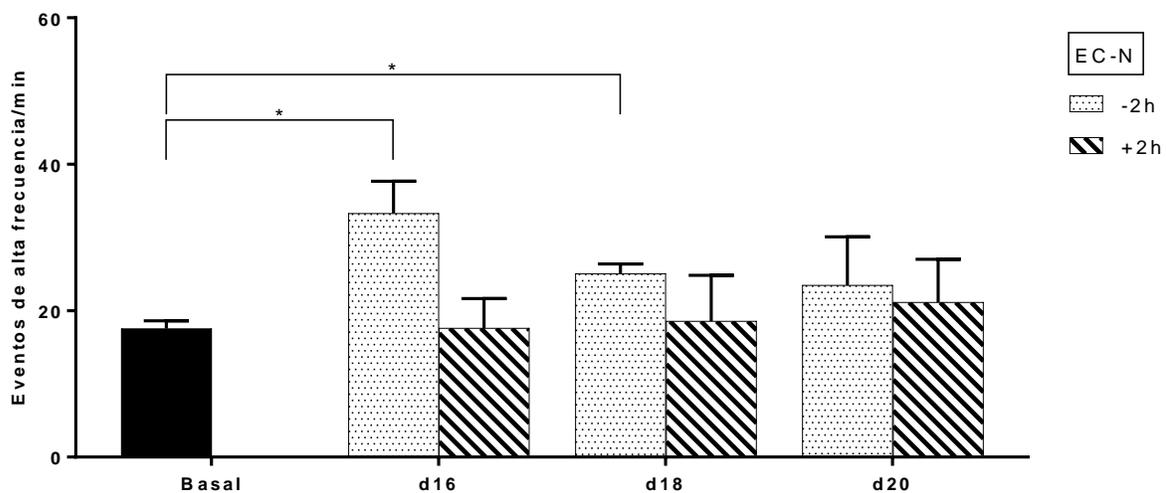
A**B**

Figura 15: Incidencia de eventos de alta frecuencia por minuto basal (barra negra) y dos horas antes y después de inyectar salino (A) o NeoSTX (B) durante la etapa de epilepsia crónica. Resultados para n=4 por grupo.

El aumento gradual en la actividad eléctrica hipocampal observado durante la epileptogénesis (Fig.14) pareciera establecerse una vez que los animales desarrollan la etapa crónica (Fig.15). En este caso, el bloqueo de las corrientes de Na^+ por la administración de NeoSTX no solo redujo la incidencia de los eventos de alta frecuencia por minuto en esta etapa inmediatamente después de inyectar la ficotoxina,

sino que además mantuvo su número por debajo de la incidencia previa a valores comparables con el basal, es decir, a valores registrados antes de inducir el SE. En consecuencia, el potencial de NeoSTX como fármaco antiepiléptico se evidencia tanto en su capacidad para controlar las crisis respecto del comportamiento de los animales como en la reducción de la actividad eléctrica hipocampal de tipo epileptiforme.

Dado que los animales tratados durante la epileptogénesis desarrollaron igualmente la etapa crónica; se registró su actividad eléctrica hipocampal en el día 15 y 21 postSE con el objetivo de evaluar si el número de eventos de alta frecuencia por minuto aumentaba entre el inicio de esta etapa y siete días después (Fig.15). Con un promedio de 43.20 ± 5.66 y 39.31 ± 7.70 (para el grupo SE-S en d15 y d21) y 44.68 ± 3.93 y 37.87 ± 9.33 (para el grupo SE-N en d15 y d21) no hubo diferencias significativas ($p=0.88$) entre los grupos.

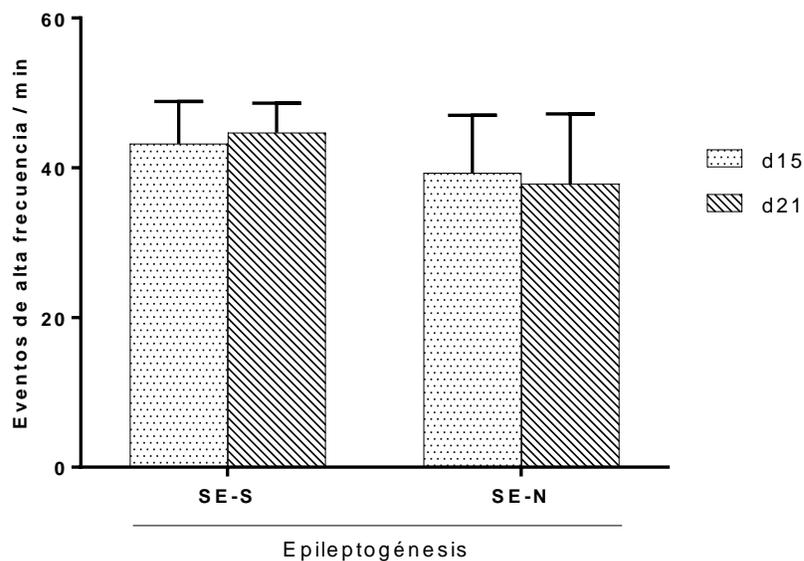


Figura 16: Número de eventos de alta frecuencia por minuto al inicio de la etapa crónica (d15) y siete días después (d21) sin diferencias significativas entre días analizados y tratamiento del animal en epileptogénesis (n=4 por grupo. Prueba de Kruskal-Wallis $p= 0.88$, seguido del test de comparaciones múltiples de Dunn, $p>0.05$).

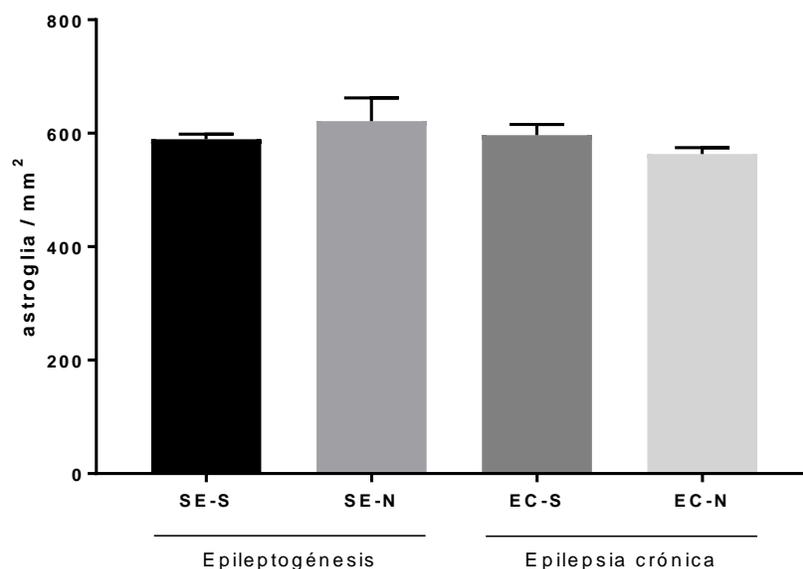
Es decir, la administración de NeoSTX durante la epileptogénesis no modificó la ventana de latencia (extender o retrasar), pues el incremento gradual de la actividad

eléctrica hipocampal que caracteriza a esta etapa, se detuvo con la aparición de las crisis motoras (en 15 días promedio desde la inducción del SE), cuya frecuencia y gravedad fue comparable con el control salino.

Efecto de NeoSTX sobre la astrogliosis hipocampal

Para evaluar el grado de astrogliosis hipocampal, como indicador de daño en el tejido cerebral, se cuantificó el número de astrocitos positivos a GFAP en siete cortes coronales por animal. Uno centrado en el sitio de inyección más tres secciones adicionales antes y después de este punto por hemisferio. La Fig.17-A muestra la cuantificación de astroglia reactiva por unidad de área del hemisferio izquierdo (centrado en la región ventral del hipocampo en el giro dentado) para un n=4 por grupo experimental, esto es: 589.60 ± 8.73 ; 621.40 ± 40.74 ; 596.60 ± 18.65 y 563.40 ± 11.35 astroglias/mm² para grupos SE-S, SE-N (inyectados en epileptogénesis) y EC-S, EC-N (para aquellos inyectados en epilepsia crónica). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p=0.42$). Por otra parte, la inspección de las fotomicrografías (Fig.17-B) muestra un giro dentado con alta presencia de astroglias en la capa granular en todos los grupos experimentales.

A



B

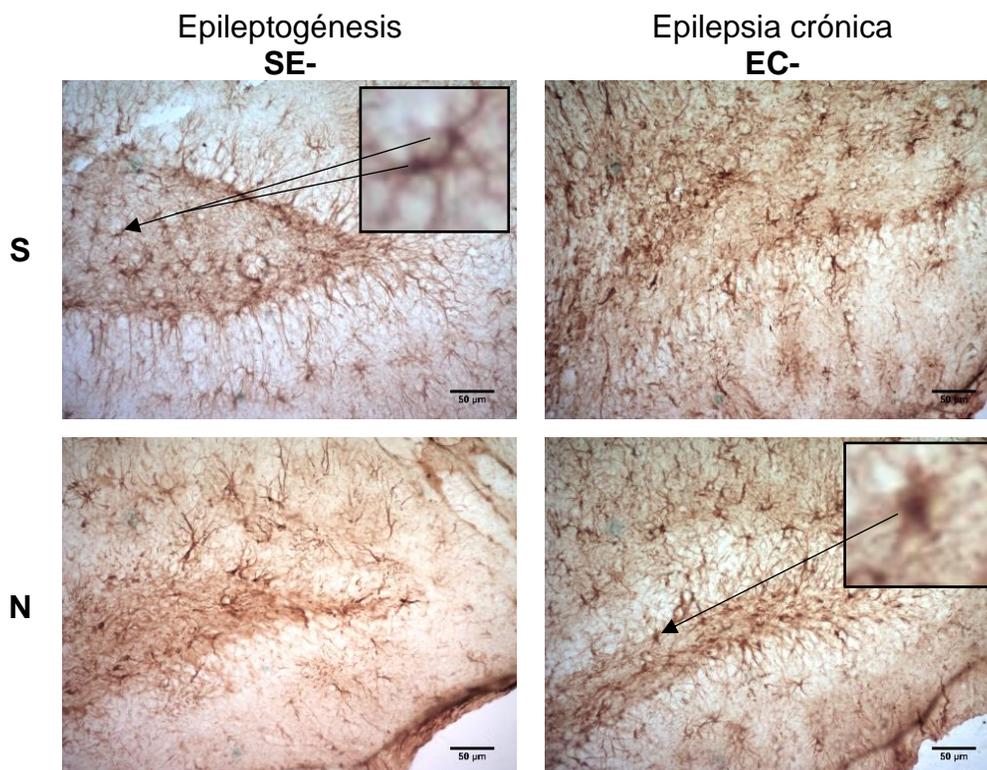


Figura 17: (A) Cuantificación de astrogliá reactiva por mm² utilizando el software ImageJ 1.48V. (B) Fotomicrografías de la región ventral del hipocampo en el giro dentado para animales tratados durante la epileptogénesis (SE-S y SE-N) y tratados durante la etapa crónica (EC-S y EC-N). El análisis estadístico no arroja diferencias significativas entre los grupos ($p=0.42$, Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples con $p>0.05$).

Aunque no hubo diferencias significativas entre los grupos, estos resultados muestran que la administración de NeoSTX en cualquiera de las dos etapas no afectó los niveles de astrogliosis en comparación con el control salino, lo que sugiere que el daño en el tejido cerebral sería consecuencia de la propia epilepsia más la lesión mecánica de las cánulas; sería conveniente tener un grupo control no intervenido para cuantificar la glía normal sin epilepsia para determinar si hubo o no gliogénesis. Ahora bien, si además consideramos que NeoSTX demostró ser capaz de controlar el número de crisis durante la etapa crónica, resultaría prometedor evaluar si el tratamiento prolongado con esta ficotoxina pudiese tener un efecto secundario positivo con respecto a limitar

el proceso de gliosis reactiva y, en consecuencia, evitar que el foco epiléptico se extienda a otras regiones del lóbulo temporal; una característica de este modelo refractario [50].

Efecto de NeoSTX sobre la prevención del deterioro de la memoria dependiente de hipocampo asociado al modelo de TLE

Previo a la cirugía de implante de cánulas-electrodos y en el día 25 postSE las ratas fueron sometidas a la tarea de reconocimiento espacial de objetos en la modalidad “*in place*”. Mediante un ANOVA de rango (Kruskall-Wallis seguido por el post hoc para comparaciones múltiples) se determinó la existencia de diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$); estas diferencias, sin embargo, se observaron únicamente entre el basal respecto de aquellos animales tratados durante la epileptogénesis (SE-S y SE-N) y el control salino en epilepsia crónica (EC-S). Como se observa en la Fig.18, todos los grupos mostraron una disminución en su capacidad de memoria respecto del basal, no obstante, este descenso no fue significativamente distinto en el grupo de epilepsia crónica tratado con NeoSTX (EC-N, $p = 0.28$).

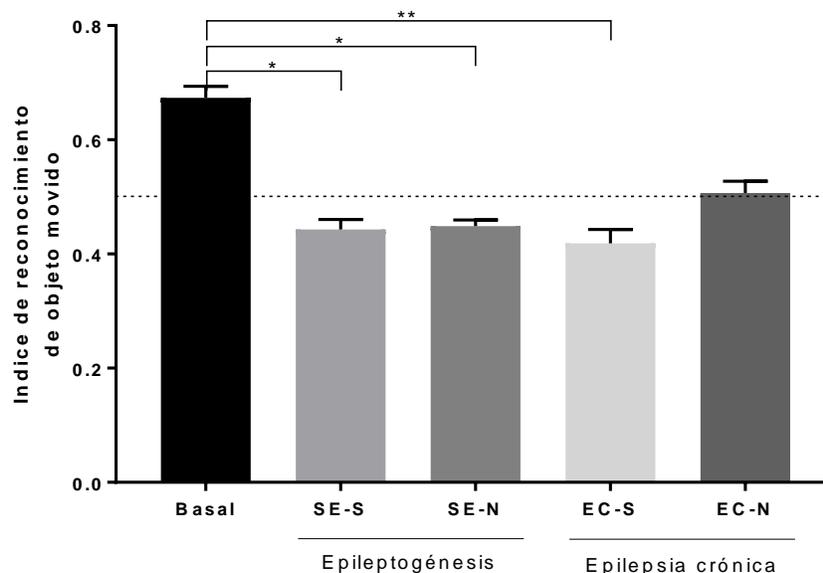


Figura 18: Capacidad de memoria basal (previo a la inducción del SE) y 25 días postSE para grupos tratados con NeoSTX o salino durante la epileptogénesis y la

etapa de epilepsia crónica. Índice de reconocimiento de objeto movido: Basal = 0.67 ± 0.02 ; grupo SE-S = 0.44 ± 0.018 ; grupo SE-N = 0.45 ± 0.01 ; grupo EC-S = 0.42 ± 0.02 y grupo EC-N = 0.51 ± 0.02 (n=4 por grupo. Prueba de Kruskal-Wallis $p < 0.05$, seguido del test de comparaciones múltiples de Dunn, $p < 0.05$ para grupos SE-S, SE-N y EC-S respecto del basal, mientras que se obtuvo un $p = 0.28$ en el caso del grupo EC-N). No hubo diferencias significativas entre los grupos tratados en epileptogénesis o epilepsia crónica independiente del tratamiento que recibieran. La línea punteada representa el azar.

Si bien es cierto el grupo tratado con NeoSTX durante la etapa crónica (EC-N) no mostró diferencias estadísticas respecto de los otros tratamientos y el momento en que se administraron (SE-S, SE-N y EC-S); al considerar sus resultados previos, es decir, disminuir efectivamente la frecuencia de las crisis motoras junto con reducir los eventos de alta frecuencia de tipo epileptiforme en el LFP con solo 3 inyecciones de NeoSTX en una semana, resulta prometedor que el índice de reconocimiento espacial de objetos de este grupo experimental no fuese significativamente diferente del basal como reflejo de una posible mejora en la capacidad de memoria espacial. Ahora bien, ciertamente se requiere aumentar el tamaño de la muestra, probar diferentes dosis y extender el periodo de tratamiento con el objetivo de validar a NeoSTX como posible fármaco antiepiléptico capaz de proteger, además, del deterioro cognitivo asociado a la epilepsia.

DISCUSIÓN

El potencial efecto antiepileptogénico y anticonvulsivante de NeoSTX, ficotoxina que bloquea de forma selectiva los canales de sodio dependientes de voltaje, se investigó en el modelo de rata de epilepsia del lóbulo temporal inducido por la administración intrahipocampal bilateral de ácido kaínico. Para ello se evaluó el número de crisis espontáneas y recurrentes, la incidencia de eventos de alta frecuencia en el LFP, gliosis reactiva mediante inmunohistoquímica y el desempeño de la memoria en una tarea de reconocimiento espacial de objetos, antes y después de la intervención experimental.

Los resultados obtenidos por Galindo et al. en 2018 [37] sobre la infusión de NeoSTX directamente en el hipocampo de ratas sanas; nos llevó a postular que la reducción de la actividad eléctrica del cerebro después del SE podría interrumpir los procesos dependientes del aumento en la excitabilidad neuronal (asociada a la administración de KA) que conducen a daño cerebral, y como consecuencia, modificar el curso de la enfermedad de tres maneras posibles: disminuyendo la frecuencia de las crisis, su intensidad y/o la latencia para la aparición de crisis espontáneas y recurrentes siempre y cuando estas ratas, tratadas durante la epileptogénesis, efectivamente desarrollaran la etapa crónica de la neuropatología. Aun cuando el tratamiento con NeoSTX no tuvo efecto durante la epileptogénesis, ciertamente tiene potencial como fármaco antiepileptico pues cumple con la definición de éste tipo de medicamentos ya que controla efectivamente la incidencia de las crisis motoras, es decir, actúa cuando se establece la etapa crónica.

Zhao et al. [51] suprimió la actividad eléctrica cerebral, incluida la de tipo epileptiforme, inyectando bilateralmente 1 μ M de TTX (que también bloquea los Navs en el sitio 1 de la subunidad α) directamente en la región CA1 del hipocampo de ratas adultas a las que se les indujo el SE mediante la administración sistémica de pilocarpina. El tratamiento se inició 12 h después del SE (que se extendió por 2 h) por 5 h diarias durante 4 días. A diferencia de las ratas control (SE-salino), la administración de TTX

durante la epileptogénesis provocó mayor pérdida celular y tendencia a la ramificación de las fibras musgosas, que no se observó en ratas sham-sham o sham-TTX. Estos resultados, en concordancia con los nuestros, sugieren que la supresión de la actividad eléctrica después del SE (durante la etapa de epileptogénesis) es perjudicial; no obstante, en un modelo de trauma cortical de epilepsia crónica, donde se aislaron cortes que fueron sometidos durante la epileptogénesis a TTX (primeras 2 semanas), se disminuyó la actividad de tipo epileptiforme; pero más interesante aún, se demostró también que el momento de la administración de TTX es crítico, es decir, si se administra TTX 4 días o más desde el aislamiento de la corteza no se observan efectos [52]. Es importante destacar que las comparaciones entre el modelo de trauma con el modelo de inducción química del SE son limitadas, sin embargo, permite plantear la existencia de mecanismos asociados con el aumento de la hiperexcitabilidad que tienen la potencialidad de modular la epileptogénesis.

Por otra parte, cuando administramos NeoSTX una vez instaurada la etapa crónica (15 días postSE) nuestra hipótesis fue comprobada. Bajo el régimen de inyecciones y concentración utilizada, tanto el número de crisis como los eventos de alta frecuencia en el LFP disminuyeron significativamente; valor que en días sin tratamiento tiende a aumentar, pero que va en descenso luego de las sucesivas inyecciones y, si bien esta mejoría no se reflejó en una disminución del nivel de gliosis reactiva respecto de los otros grupos experimentales (que pudiese evidenciar un posible rol neuroprotector de NeoSTX), ciertamente sugiere que el daño en el tejido cerebral es inherente al modelo implementado y que no es agravado aún más por la administración de NeoSTX. Experimentos adicionales se necesitan para determinar la densidad de glías en un cerebro normal -no epiléptico- para determinar si nuestra intervención aumenta o no la gliosis.

Está ampliamente aceptado que todos los fármacos antiepilépticos aprobados, incluso aquellos que demuestran ser más efectivos en el control de las crisis, tienen el potencial de ejercer efectos perjudiciales sobre la función cognitiva. La dosis administrada está limitada, en consecuencia, por la toxicidad del fármaco respecto de

su tolerancia y biodisponibilidad, pero también por los posibles efectos secundarios. Así, fármacos como el fenobarbital, fenitoína y ácido valproico provocan amnesia dosis-dependiente en ratas, mientras que en humanos se reporta dificultad de atención y memoria, así como disminución de las funciones visuomotoras y velocidad mental, entre otros [10, 53]. Es por ello que los resultados respecto de la capacidad de memoria espacial resultan prometedores. Si bien las ratas tratadas con NeoSTX en etapa crónica también disminuyeron su capacidad frente al basal, la no existencia de diferencias significativas entre ambos estados, con solo tres dosis de NeoSTX, abre la posibilidad de evaluar en mayor profundidad si el tratamiento a largo plazo y a concentraciones diferentes pudiese ser beneficioso sobre el deterioro cognitivo asociado a la epilepsia.

Varios estudios han demostrado que la Potenciación a Largo Plazo (LTP, por sus siglas en inglés) puede verse alterada por las crisis de epilepsia [54]. Lee et al. [55] demostró, en cortes de hipocampo centrados en CA1, que medicamentos como el fenobarbital, fenitoína y ácido valproico pueden bloquear, reducir e incluso suprimir el LTP tanto dependiente como independiente del receptor de NMDA (NMDA-LTP y VDCC-LTP, respectivamente), que podría explicar, al menos en parte, las disfunciones en la memoria asociadas con la terapia anticonvulsivante crónica. Por el contrario, Arendt et al. [56] demostró que el LTP entre las sinapsis colaterales de Schaffer y CA1 mejora en cortes de hipocampo de ratón cuya actividad eléctrica neuronal fue bloqueada con TTX por 60 h mediante dos mecanismos: (1) incrementando la abundancia de receptores AMPA y NMDA en las sinapsis existentes y (2) promoviendo la presencia de nuevas sinapsis glutamatérgicas que contienen solo receptores NMDA; sinapsis silentes que se “activan” mediante la inserción de receptores AMPA al inducir LTP y que, consecuentemente, conducen a una mejora en su magnitud. Ahora bien, de nuestros resultados no podemos aventurar que NeoSTX, en el marco de la epilepsia, ejerza un mecanismo similar que el inducido por TTX en ratas sanas. Sin embargo, es plausible que cambios a nivel de plasticidad neuronal participen del descenso constante en el número de crisis motoras por las sucesivas inyecciones de NeoSTX, de la mano con la reducción de los eventos de alta frecuencia en el LFP.

Ahora bien, se requieren análisis adicionales para determinar si este control efectivo de las crisis se sostiene a largo plazo y que, en consecuencia, también pudiesen limitar el daño en el tejido cerebral y/o el deterioro cognitivo característico de este modelo, especialmente teniendo en consideración que en este trabajo únicamente probamos una concentración de NeoSTX, por lo que el perfil de tolerabilidad de este potencial fármaco no ha sido evaluado.

El hecho que NeoSTX ejerza un efecto anticonvulsivante, pero no antiepileptogénico en nuestro modelo, refuerza la hipótesis de la presencia de mecanismos diferenciales que inciden en que un cerebro se torne epiléptico. Cuando el SE es inducido por la administración de KA o pilocarpina, se ha informado que la expresión del canal Nav1.6 se reduce constantemente durante la epileptogénesis [57]; alteración (equivalente para los Nav1.1 y Nav1.2) que ocurre de manera diferencial en distintas subregiones del hipocampo y que, además, sigue un curso temporal específico [58]. Ahora bien, a pesar que los niveles de expresión por sí solos no son suficientes para explicar los cambios de la red neuronal, inferir causalidad de la epileptogénesis o su posterior impacto en la fase crónica, ciertamente sugieren que el bloqueo de las corrientes de Na⁺ por la administración de NeoSTX en esta primera etapa no mediaría mayores cambios respecto de la progresión de la neuropatología. Por otra parte, la expresión de los Navs en el hipocampo postSE es diferencial también respecto del método utilizado para generar el modelo de epilepsia [59]. Al contrario de lo que ocurre cuando se induce el SE mediante *kindling*, si el SE se logra de manera química, la expresión de estos canales se ve aumentada notablemente en los astrocitos reactivos en lugar de las neuronas u otras células gliales durante la epileptogénesis, patrón que va cambiando a medida que se progresa a la fase crónica y que podría dar cuenta de un nuevo mecanismo de comunicación entre ambos tipos celulares que, finalmente, facilitaría la hiperexcitabilidad de la red neuronal.

Los astrocitos cumplen una serie de funciones en el SNC, en donde los Navs podrían proporcionar una vía para que ingrese Na⁺ de manera de mantener la concentración interna necesaria para la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa y así apoyar la homeostasis

iónica global, especialmente los flujos de K^+ . El Nav1.5 es predominante en este tipo celular y sus niveles de expresión se reportan aumentados en respuesta al daño. En este caso, los astrocitos responden a través del proceso denominado astrogliosis reactiva que implica migración, proliferación y liberación de múltiples mediadores de la respuesta inmune [60]. Se desconoce cómo los Navs podrían participar del proceso de astrogliosis reactiva, sin embargo, debido a que la expresión del Nav1.5 se encuentra sobre-regulada en este caso, surge como posible blanco terapéutico. Ahora bien, respecto de nuestra investigación, el Nav1.5 es clasificado como resistente a TTX [61], por lo que antes de afirmar que NeoSTX no ejerce efecto durante la epileptogénesis, sería interesante probar una dosis superior y/o iniciar el tratamiento inmediatamente después de inducir el SE, junto con extender el tiempo de administración.

Ahora bien, controlar los síntomas de la epilepsia por la administración de NeoSTX durante la etapa crónica era esperable. Inhibidores farmacológicos de Navs se han utilizado durante décadas para tratar las crisis [19]; estos tienden a ser eficaces contra crisis tónico-clónicas focales (como en el modelo empleado) y generalizadas primarias, mientras que pueden no tener efecto alguno o incluso empeorar la mayoría de las otras epilepsias generalizadas. Por ello, a pesar que se han logrado avances importantes de cómo estos agentes antiepilépticos ejercen sus efectos a nivel celular, no es posible relacionar de forma directa su modo de acción (incluyendo el potencial antiepiléptico de NeoSTX) con la eficacia para controlar los diferentes tipos de crisis que se puedan presentar en los diferentes tipos de epilepsias [25].

CONCLUSIONES

El tratamiento con NeoSTX no impide el desarrollo de la neuropatología en el modelo KA-TLE cuando se administra durante la etapa de epileptogénesis. A pesar que NeoSTX redujo la actividad eléctrica hipocampal a niveles comparables con el basal, todos los animales tratados durante la epileptogenesis evolucionaron hacia una etapa crónica al mismo tiempo que el grupo control, sin diferencias en términos de frecuencia o gravedad de las crisis.

Muy distinto fue el caso de la administración de NeoSTX durante la etapa crónica donde se observó una reducción de la actividad eléctrica de tipo epiléptica en el hipocampo, en paralelo con una disminución de las crisis a nivel conductual en los animales y de manera progresiva con las sucesivas inyecciones.

El hallazgo de que la administración de NeoSTX tenga un efecto positivo sobre el control de las crisis sólo cuando es inyectada en la etapa crónica se corresponde con la hipótesis que plantea la existencia de múltiples mecanismos por los cuales un cerebro puede volverse epiléptico en las diferentes etapas de la patología. Uno de estos posibles mecanismos hace referencia a la expresión diferencial de los Navs en distintos tipos celulares durante el despliegue de la epilepsia y cómo estos mediarían en el aumento de la excitabilidad neuronal. Ahora bien, el bloqueo de estos canales por la acción de NeoSTX no se tradujo en cambios significativos sobre el nivel de astrogliosis en el periodo observado en ninguno de los grupos experimentales, sin embargo, el descenso constante del número de crisis motoras por las sucesivas inyecciones de NeoSTX, junto con su efecto sobre el LFP, podría indicar que esta ficotoxina provoca cambios a nivel de plasticidad neuronal, que a largo plazo podrían repercutir en una mejora en la capacidad de memoria, la supresión completa de las crisis y/o limitar el proceso de gliosis reactiva al evitar que el foco epiléptico se extienda hacia otras regiones del cerebro. Se requieren análisis adicionales para confirmar esta idea.

Nuestros resultados, por lo tanto, apoyan el potencial uso de NeoSTX como fármaco antiepiléptico pues controla el síntoma primario de la epilepsia, disminuyendo la incidencia de las crisis en etapa crónica paralelamente con la actividad eléctrica hipocampal de tipo epileptiforme.

BIBLIOGRAFÍA

1. Scharfman, H.E. (2007) The neurobiology of epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 7(4):348-54.
2. W.H.O (2019) *Epilepsy: a public health imperative*, Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
3. Alvarado, L. and Ivanovic-Zivic, R.F. (2013) Adherence to treatment in epilepsy: still an unresolved issue. *Rev Med Chil*, 141(8):1085-6.
4. Levesque, M. and Avoli, M. (2013) The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev*, 37(10 Pt 2):2887-99.
5. Lima, I.V.A., et al. (2016) Postictal alterations induced by intrahippocampal injection of pilocarpine in C57BL/6 mice. *Epilepsy Behav*, 64(Pt A):83-89.
6. Buckmaster, P.S. (2004) Laboratory animal models of temporal lobe epilepsy. *Comp Med*, 54(5):473-85.
7. Dudek, F.E., et al. (2006) Kainate-Induced Status Epilepticus: A Chronic Model of Acquired Epilepsy, in *Models of Seizures and Epilepsy*, A. Pitkänen, P.A. Schwartzkroin, and S.L. Moshé, Editors. 2006, Elsevier Academic Press. 415-432.
8. Motamedi, G. and Meador, K. (2003) Epilepsy and cognition. *Epilepsy & Behavior*, 25-38.
9. Engel, J., Jr., et al. (2012) Early surgical therapy for drug-resistant temporal lobe epilepsy: a randomized trial. *JAMA*, 307(9):922-30.
10. Eddy, C.M., Rickards H.E., and Cavanna, A.E. (2011) The cognitive impact of antiepileptic drugs. *Ther Adv Neurol Disord*, 4(6):385-407.
11. Kerr, M.P. (2012) The impact of epilepsy on patients' lives. *Acta Neurol Scand Suppl*, (194):1-9.
12. Bertram, E., (2007) The Relevance of Kindling for Human Epilepsy. *Epilepsia*, 48(s2):65-74.
13. Buckmaster, P.S. (2017) Comparative Biology and Species Effects on Expression of Epilepsy, in *Models of Seizures and Epilepsy*, A. Pitkänen, et al., Editors, Academic Press. 7-19.

14. Bragin, A., et al. (1999) Electrophysiologic analysis of a chronic seizure model after unilateral hippocampal KA injection. *Epilepsia*, 40(9):1210-21.
15. Velíšková, J. and Velišek, L. (2017) Behavioral Characterization and Scoring of Seizures in Rodents, in *Models of Seizures and Epilepsy*, A. Pitkänen, et al., Editors, Elsevier Academic Press. 111-123.
16. Löscher, W., Ferland, R.J. and Ferraro, T.N. (2017) Strain Effects on Expression of Seizures and Epilepsy, in *Models of Seizures and Epilepsy*, A. Pitkänen, et al., Editors, Elsevier Academic Press. 21-38.
17. Barker-Haliski, M. and White, H.S. (2017) Use of Animal Models for Epilepsy Research and Therapy Development, in *Models of Seizure and Epilepsy*, A. Pitkänen, et al., Editors, Elsevier Academic Press. 83-94.
18. Catterall, W.A. (2000) From Ionic Currents to Molecular Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron*, 26(1):13-25.
19. Mantegazza, M., et al. (2010) Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *The Lancet Neurology*, 9(4):413-424.
20. Cestèle, S. and Catterall, W.A. (2000) Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*, 82(9-10):883-892.
21. Goldin, A.L., et al. (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 28(2):365-8.
22. Catterall, W.A., et al. (2008) Inherited neuronal ion channelopathies: new windows on complex neurological diseases. *J Neurosci*, 28(46):11768-77.
23. Hargus, N.J., et al. (2013) Evidence for a role of Nav1.6 in facilitating increases in neuronal hyperexcitability during epileptogenesis. *J Neurophysiol*, 110(5):1144-57.
24. Wong, J.C., et al. (2018) Selective targeting of Scn8a prevents seizure development in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Sci Rep*, 8(1):126.
25. Sills, G.J. (2011) Mechanisms of action of antiepileptic drugs, in *Epilepsy: From Science to Society. A Practical Guide to Epilepsy*, M.C.W. J. W. Sander, & J. E. Smalls, Editor.
26. Kahlig, K.M., et al. (2010) Ranolazine selectively blocks persistent current evoked by epilepsy-associated Nav1.1 mutations. *Br J Pharmacol*, 161(6):1414-26.

27. England, S. and de Groot, M.J. (2009) Subtype-selective targeting of voltage-gated sodium channels. *Br J Pharmacol*, 158(6):1413-25.
28. Lagos, N. (2014) Clinical applications of paralytic shellfish poisoning toxins, in *Toxins and Biologically Active Compounds from Microalgae, Volume II*, G.P. Rossini, Editor. CRC Press: New York. 309-329.
29. Garrido, R., et al. (2005) Gonyautoxin: new treatment for healing acute and chronic anal fissures. *Dis Colon Rectum*, 48(2):335-40.
30. Lagos, N. (1998) Microalgal blooms: a global issue with negative impact in Chile. *Biol Res*, 31(4):375-386.
31. Oshima, Y. (1995) Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Int*, 78:528-532.
32. Schantz, E.J., et al. (1957) Paralytic Shellfish Poison. VI. A Procedure for the Isolation and Purification of the Poison from Toxic Clam and Mussel Tissues. *Journal of the American Chemical Society*, 79(19):5230-5235.
33. Schantz, E.J., et al. (1975) Structure of saxitoxin. *Journal of the American Chemical Society*, 97(5):1238-1239.
34. Lagos, N. (2002) Principales Toxinas de Origen Fitoplactónico: Identificación y Cuantificación Mediante HPLC, in *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía.
35. Penzotti, J.L., et al. (2007) Specific Neosaxitoxin Interactions with the Na⁺ Channel Outer Vestibule Determined by Mutant Cycle Analysis. *Biophysical Journal*, 80(2):698-706.
36. Rodríguez-Navarro, A.J., et al. (2007) Neosaxitoxin as a Local Anesthetic: Preliminary Observations from a First Human Trial. *Anesthesiology*, 106(2):339-345.
37. Galindo, J., et al. (2018) Long-lasting, reversible and non-neurotoxic inactivation of hippocampus activity induced by neosaxitoxin. *J Neurosci Methods*, 308:197-204.
38. Cusick, K.D. and Sayler, G.S. (2013) An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Mar Drugs*, 11(4):991-1018.
39. Manríquez, V., et al. (2015) First evidence of neosaxitoxin as a long-acting pain blocker in bladder pain syndrome. *International Urogynecology Journal*, 26(6):853-858.

40. Hinzpeter, J., et al. (2016) Gonyautoxins: First evidence in pain management in total knee arthroplasty. *Toxicon*, 119:180-5.
41. Hinzpeter, J., et al. (2018) New Pain Management Procedure after Total Knee Arthroplasty: Gonyautoxins are Safe and Effective after A Single Intra-Articular Infiltration. *International Physiology Journal*, 1:15-25.
42. Perez, S., et al. (2011) Determination of toxicity equivalent factors for paralytic shellfish toxins by electrophysiological measurements in cultured neurons. *Chem Res Toxicol*, 24(7):1153-7.
43. Kaplan, D.I., Isom, L.L. and Petrou, S. (2016) Role of Sodium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(6).
44. Trinka, E. (2012) Ideal characteristics of an antiepileptic drug: how do these impact treatment decisions for individual patients? *Acta Neurol Scand Suppl*, (194):10-8.
45. Lagos, N. and Andrinolo, D. (2000) Paralytic Shellfish Poisoning (PSP): Toxicology and Kinetics, in *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*, L.M. Botana, Editor. Marcel Dekker Inc.: New York. 203-215.
46. Proctor, C.M., et al. (2018) Electrophoretic drug delivery for seizure control. *Sci Adv*, 4(8):1-8.
47. Paxinos, G. and Watson, C. (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
48. Racine, R.J. (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 32(3):281-294.
49. Barker, G.R. and Warburton, E.C. (2011) When is the hippocampus involved in recognition memory? *J Neurosci*, 31(29):10721-31.
50. Castro, O.W., et al. (2011) Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. *Brain Res*, 1374:43-55.
51. Zhao, Q., Raghavendra, M. and Holmes, G.L. (2008) Effect of TTX suppression of hippocampal activity following status epilepticus. *Seizure*, 17(7):637-45.

52. Graber, K.D. and Prince, D.A. (2004) A critical period for prevention of posttraumatic neocortical hyperexcitability in rats. *Ann Neurol*, 55(6):860-70.
53. Thompson, P.J. (1992) Antiepileptic drugs and memory. *Epilepsia*, 6(6):37-40.
54. Han, T., et al. (2016) Seizure induced synaptic plasticity alteration in hippocampus is mediated by IL-1 β receptor through PI3K/Akt pathway. *Am J Transl Res*, 8(10):4499-4509.
55. Lee, G.Y.P., Brown, L.M. and Teyler, T.J. (1996) The effects of anticonvulsant drugs on long-term potentiation (LTP) in the rat hippocampus. *Brain Research Bulletin*, 39(1):39-42.
56. Arendt, K.L., Sarti, F. and Chen, L. (2013) Chronic inactivation of a neural circuit enhances LTP by inducing silent synapse formation. *J Neurosci*, 33(5):2087-96.
57. Ellerkmann, R.K., et al. (2003) Molecular and functional changes in voltage-dependent Na⁺ channels following pilocarpine-induced status epilepticus in rat dentate granule cells. *Neuroscience*, 119(2):323-333.
58. Qiao, X., et al. (2013) Expression of sodium channel alpha subunits 1.1, 1.2 and 1.6 in rat hippocampus after kainic acid-induced epilepsy. *Epilepsy Res*, 106(1-2):17-28.
59. Zhu, H., et al. (2016) Remarkable alterations of Na_v1.6 in reactive astrogliosis during epileptogenesis. *Sci Rep*, 2016. 6:38108.
60. Pappalardo, L.W., Black, J.A. and Waxman, S.G. (2016) Sodium channels in astroglia and microglia. *Glia*, 64(10):1628-45.
61. Rogart, R.B., et al. (1989) Molecular cloning of a putative tetrodotoxin-resistant rat heart Na⁺ channel isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(20):8170-4.