



Posgrado en
Biología Experimental

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**MODIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA SV2A DURANTE LA GENERACIÓN DE LA
EPILEPSIA Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA AL LEVETIRACETAM**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA

M. en C. ITZEL JATZIRI CONTRERAS GARCÍA

COMITÉ TUTOR

Co-Directora: Dra. Julieta Mendoza Torreblanca

Co-Directora: Dra. Beatriz Gómez González

Asesor: Dr. Emilio Domínguez Salazar

Junio 2019

“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020”.

El trabajo fue realizado en el laboratorio de Neurociencias de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Beatriz Gómez González y el Dr. Emilio Domínguez Salazar y en el laboratorio de Neurociencias del Instituto Nacional de Pediatría bajo la dirección de la Dra. Julieta G. Mendoza Torreblanca.

El presente trabajo fue realizado con recursos de los proyectos: 111/2012 del Instituto Nacional de Pediatría y SALUD-2012-01-180069 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

La sustentante recibió beca CONACyT con registro No. 425308

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis titulada “Modificación de la proteína SV2A durante la generación de la epilepsia y su asociación con la respuesta al levetiracetam”, que presentó

Itzel Jatziri Contreras García

El día 14 de junio del año 2019

Presidente Dr. Emilio Domínguez Salazar

Secretario Dra. Karla Berenice Sánchez Huerta

Vocal 1 Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

Vocal 2 Dr. Bryan Víctor Phillips Farfán

Vocal 3 Dr. Sergio Roberto Zamudio Hernández

COMITÉ TUTOR

Co-Directora: Dra. Julieta Mendoza Torreblanca

Co-Directora: Dra. Beatriz Gómez González

Asesor: Dr. Emilio Domínguez Salazar

DEDICATORIAS

A *mis padres* por ser los principales promotores de mis logros académicos. Gracias por su confianza y aliento incondicional, por levantarme y animarme en cada caída, por enseñarme que la perseverancia te lleva a alcanzar tus metas. Y agradezco aún más el amor que me han proporcionado a manos llenas y su infinita parsimonia ante la vida.

A *mi abuela* por educarme de una manera poco convencional. Por abrirme su corazón y su mente con miles de consejos e historias. Por amarme como sólo una madre sabe hacerlo.

A *mi hermano* por ser una de las personas a quien más amo y admiro en la vida. Por estar presente en mis logros y frustraciones, por escucharme y regañarme y sobre todo por hacerme feliz con solo escucharte.

A *Andrés* por ser mi “unicuerpo”, por apoyarme en momentos complicados de la vida y por hacerme reír en la cotidianidad. Por saberme entender y amar a pesar de nuestras diferencias. Por formar parte de mi vida, gracias.

A *mis gordos* porque de manera incondicional están felices de verme.

A *Julieta* por impulsarme en el camino de las neurociencias, por su larga amistad y sobre todo, por creer en mí.

A *Adriana* por vivir conmigo las alegrías y frustraciones del doctorado. Por brindarme su conocimiento.

A *Karla* por sus enseñanzas, por escucharme, por su paciencia infinita y por su amistad.

A *mis amigos* por salvarme en todos los sentidos posibles.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi comité tutor por las observaciones y preguntas constantes realizadas a lo largo de todo el doctorado. Por las sugerencias experimentales y por generarme una visión más crítica con respecto a la ciencia.

Agradezco a mi jurado por el tiempo dedicado en la corrección de la tesis y por las sugerencias brindadas para su concreción.

Al M. en C. Marcial Gerardo Barragán Mejía y a la Dra. Noemí Cárdenas Rodríguez por abrirme las puertas del laboratorio de neurociencias del Instituto Nacional de Pediatría.

A la técnico María Sara Navarrete Hernández y la químico Mercedes Edna García Cruz por el infinito apoyo brindado, sin ustedes, el trabajo no hubiera salido en el tiempo programado.

Al ingeniero Luis Ricardo Gallardo Gudiño porque sin él, el manejo del equipo de electrofisiología aún seguiría siendo una utopía.

A la Dra. Karla Sánchez Huerta por introducirme en el mundo de la electrofisiología, por sus infinitas enseñanzas y tiempo dedicado.

A la Dra. América Vanoye Carlo por hacerme partícipe en sus discusiones.

A las técnico Gabriela Esquivel y Elvia Ramírez por el apoyo técnico.

A la Dra. Karla Carvajal Aguilera por hacerme parte de su laboratorio.

A Gilberto Cárdenas Marcial y al MVZ Ramón García Cortés por los animales proporcionados durante mi estancia en el instituto.

A Rogelio Ramírez Hernández por ser mi primer alumno y porque me ayudó a crecer gracias a su visión crítica y analítica.

A Monserrat López Guerrero, Natalia Hernández Carrera y Ricardo Quiroz Castañeda por su apoyo en el análisis de datos electrofisiológicos, así como ayuda experimental.

Al Dr. Juan Luis Chávez Pacheco y a la técnico Blanca A. Ramírez Mendiola por su apoyo con la técnica de HPLC.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE ABREVIATURAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
INDICE DE TABLAS	XII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
1. ANTECEDENTES	1
1.1 EPILEPSIA	1
1.1.1 Definición.....	1
1.1.2 Clasificación	1
1.1.3 Crisis epilépticas.....	3
1.1.3.1 Clasificación de las crisis epilépticas	3
1.1.4 Epilepsia del lóbulo temporal	4
1.2 MODELO ANIMAL DE EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL Y SU FISIOPATOLOGÍA.....	7
1.2.1 Modelo animal de ELT inducido con litio-pilocarpina.....	7
1.2.2 Hipocampo y Giro dentado	9
1.2.2.1 Circuito trisináptico	9
1.2.2.1.1 Giro dentado.....	10
1.2.2.1.2 Hipocampo o <i>Cornu Ammonis</i> (CA).....	13
1.3 LEVETIRACETAM	15
1.3.1 Generalidades	15
1.3.2 Principal mecanismo de acción del levetiracetam a través de la SV2A.	16
1.4 PROTEÍNA DE VESÍCULAS SINÁPTICAS 2A, BLANCO TERAPÉUTICO DEL FÁRMACO ANTICONVULSIVO LEVETIRACETAM	19
1.4.1 Proteínas de vesículas sinápticas 2	19
1.4.2 Función de la proteína SV2A	21

1.4.3 SV2A y epilepsia.....	22
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVOS.....	25
5.1 Objetivo General	25
5.2 Objetivos particulares	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
7. RESULTADOS.....	33
8. DISCUSIÓN	52
9. CONCLUSIONES	57
10. REFERENCIAS.....	57
ANEXO1.....	64
ANEXO 2.....	94

TABLA DE ABREVIATURAS

AMPA	Ácido- α -metilo-4-isoxazolpropiónico
AP	Eje antero posterior
CA	<i>Cornu Ammonis</i>
CA1	Sector 1 del <i>Cornu Ammonis</i>
CA3	Sector 3 del <i>Cornu Ammonis</i>
CCTV	Circuito cerrado de televisión
C-terminal	Carboxilo terminal
Ctrl	Control
Ctrl L	Grupo control tratado con levetiracetam
DA	Dorsal anterior
DAB	3,3'-diaminobencidina
DP	Dorsal posterior
DO	Densidad óptica
DV	Eje dorso ventral
DVR	Grabación digital de video
EEG	Electroencefalograma
EEPI	Grupo epiléptico temprano
ELT	Epilepsia del lóbulo temporal
EPI	Grupo epiléptico
EPI R	Grupo epiléptico responsivo al levetiracetam
EPI NR	Grupo epiléptico no responsivo al levetiracetam
FCS	Suero fetal bovino
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
GABA	Ácido γ -aminobutírico
Gr	Capa granular
H	Hilus
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HICAP	Células hilares relacionadas con la vía comisural de asociación
HIPP	Células hilares asociadas con la vía perforante

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
KO	<i>Knock out</i>
LEPI	Grupo epiléptico tardío
Lev	Levetiracetam
LM	<i>Stratum lacunosum moleculare</i>
ML	Eje latero medial
Mol	Capa molecular
MOPP	Células de la capa molecular asociadas con la vía perforante
NMDA	N-metil-D-aspartato
N-terminal	Amino terminal
OCA1	<i>Stratum oriens</i> de CA1
OCA3	<i>Stratum oriens</i> de CA3
O-LM	<i>Oriens-lacunosum-moleculare</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PB	Amortiguador de fosfatos
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PCA1	Capa piramidal de CA1
PCA3	Capa piramidal de CA3
PDS	Desplazamiento despolarizante paroxístico
PET	Tomografía por emisión de positrones
RCA1	<i>Stratum radiatum</i> de CA1
RCA3	<i>Stratum radiatum</i> de CA3
SE	<i>Status epilepticus</i>
SEM	Error estándar de la media
SL	<i>Stratum lucidum</i>
SV2	Proteína de vesículas sinápticas 2
SV2A	Proteína de vesículas sinápticas 2A
V	Ventral
VGAT	Transportador vesicular para GABA
VGLUT1	Transportador vesicular 1 para glutamato
VGLUT2	Transportador vesicular 2 para glutamato
VGLUT3	Transportador vesicular 3 para glutamato

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de la epilepsia.....	2
Figura 2. Correlato intracelular de la espiga epileptiforme.....	6
Figura 3. Giro dentado e hipocampo..	9
Figura 4. Circuito trisináptico.....	10
Figura 5. Contactos sinápticos de las neuronas granulares	11
Figura 6. Interneuronas presentes en el giro dentado.....	12
Figura 7. Interneuronas presentes en el hipocampo	14
Figura 8. Estructura química del levetiracetam.	16
Figura 9. Sitios de unión putativos entre la SV2A y el levetiracetam.....	17
Figura 10. Propuesta del mecanismo de acción del levetiracetam	18
Figura 11. Representación de la proteína SV2A.....	20
Figura 12. Diseño experimental para el objetivo particular 1..	27
Figura 13. Capas analizadas del hipocampo dorsal anterior, posterior y ventral..	30
Figura 14. Diseño experimental para el objetivo particular 2..	32
Figura 15. Fotomicrografía que muestra la inmunorreactividad de SV2A en el hipocampo de un animal control.....	35
Figura 16. Densidad óptica de SV2A en el hipocampo de un animal control.....	36
Figura 17. Inmunorreactividad de la SV2A en el eje temporo-medial.....	37
Figura 18. Principales variaciones de la inmunorreactividad de SV2A en la línea temporal de la generación de la epilepsia.	38
Figura 19. Diagrama de caja y bigotes que representa el aumento de la densidad óptica de la proteína SV2A en el grupo SE.....	40

Figura 20. Diagrama de caja y bigotes que representa la disminución de la densidad óptica de la proteína SV2A en el grupo EEPI	40
Figura 21. Diagrama de caja y bigotes que representa el aumento de la densidad óptica de la proteína SV2A en el grupo LEPI.....	41
Figura 22. Diagrama de caja y bigotes que representa las modificaciones de la densidad óptica de SV2A en el curso temporal de la epilepsia	42
Figura 23. Fotomicrografía que muestra la inmunorreactividad de VGAT y VGLUT1 en el hipocampo de un animal control.....	43
Figura 24. Incremento de la inmunorreactividad de VGAT y VGLUT1 en el SE.	44
Figura 25. Colocalización de SV2A y VGAT en la capa granular y PCA1 en el grupo SE.	45
Figura 26. Colocalización de SV2A/VGAT y SV2A/VGLUT1 en PCA3 en el grupo SE	46
Figura 27. Gráfica de barras que representa la densidad óptica de VGAT y VGLUT1 en el SE.....	47
Figura 28. Fotomicrografías que ilustran la inmunorreactividad de VGAT y VGLUT1 en el grupo epiléptico tardío.....	47
Figura 29. Gráfica de barras que representa la densidad óptica de VGAT y VGLUT1 en el grupo epiléptico tardío.....	48
Figura 30. Micrografías que muestran la inmunorreactividad de SV2A de animales tratados con levetiracetam.....	50
Figura 31. Diagrama de caja y bigotes que representa la densidad óptica de la proteína SV2A en los grupos tratados con levetiracetam	51
Figura 32. Diagrama de caja y bigotes que representa la densidad óptica de la proteína SV2A en la capa molecular y el <i>stratum lacunosum moleculare</i>	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de las crisis epilépticas	4
Tabla 2	Niveles en sangre del fármaco y la frecuencia de crisis espontáneas en ratas tratadas con levetiracetam	49

RESUMEN

La proteína de vesícula sináptica 2A (SV2A) se ha convertido en un atractivo blanco de investigación debido a su posible papel en la fisiopatología de la epilepsia. Esta proteína se encuentra expresada de manera ubicua en todas las terminales nerviosas de manera independiente del neurotransmisor que contenga. En pacientes con epilepsia refractaria y en modelos animales de epilepsia se ha reportado una disminución en la inmunorreactividad de SV2A. Este decremento podría estar asociada directamente con la gran variabilidad en la respuesta al tratamiento con levetiracetam, un fármaco cuyo blanco es la SV2A. Por ello, el presente trabajo evaluó las modificaciones en la inmunorreactividad de SV2A en el hipocampo de ratas, a lo largo de la generación de la epilepsia. También se analizó la relación entre los cambios de la inmunorreactividad de la proteína durante la epilepsia tardía y la respuesta al fármaco levetiracetam. Por ello, se usó un modelo de epilepsia del lóbulo temporal inducida con litio-pilocarpina, debido a que semeja con alta fidelidad los cambios observados en pacientes con este desorden neurológico. Se administró pilocarpina a ratas macho para inducir *status epilepticus* (SE), el cual duró 90 minutos; este grupo fue sacrificado 1 hora posterior al SE. Otros grupos de ratas (epiléptico temprano y tardío) se mantuvieron en condiciones normales después de la generación del SE hasta su sacrificio. Estos grupos fueron video-monitoreados de 8:00 am a 6:00 pm para evaluar las crisis conductuales; el grupo epiléptico temprano se sacrificó el día 10 posterior al SE y el epiléptico tardío el día 56; en otro grupo se realizó el mismo procedimiento que para el grupo epiléptico tardío, pero en el día 49 se les implantó bombas osmóticas que liberaron levetiracetam (260 mg/kg s.c.) por una semana y se sacrificaron el día 56. Se obtuvo el cerebro de ratas y se evaluó la inmunorreactividad de SV2A por inmunohistoquímica en 10 capas del hipocampo. Se observó un aumento en la inmunorreactividad de SV2A asociado al sistema GABAérgico en capas principalmente somáticas durante el SE. En la epilepsia tardía la inmunorreactividad de SV2A aumentó en capas con conexiones axo-dendríticas y no hubo relación con algún neurotransmisor. Por otro lado, posterior al tratamiento con levetiracetam se

dividieron las ratas en dos grupos, el responsivo y el no responsivo. Aunque se observó una gran variabilidad en los niveles de la SV2A durante la epilepsia tardía, los animales con menor inmunorreactividad de SV2A no respondieron al tratamiento con el fármaco antiepiléptico.

ABSTRACT

Synaptic vesicle protein 2A (SV2A) has become an attractive target of investigation due to its possible role in the pathophysiology of epilepsy. This protein is expressed ubiquitously in all nerve terminals independently of their neurotransmitter content. A decrease in SV2A levels has been reported in patients with refractory epilepsy and in animal models of epilepsy. This reduction may be directly associated with the great variability in the response to treatment with levetiracetam, a drug that targets SV2A. Thus, the present study evaluated modifications in SV2A expression in the hippocampus of rats throughout the generation of epilepsy. The association between changes in this protein levels during late epilepsy and the response to the levetiracetam was also analyzed. A model of temporal lobe epilepsy induced with lithium-pilocarpine was used, since it resembles with high fidelity the changes observed in patients with this neurological disorder. Wistar male rats were treated with pilocarpine to induce status epilepticus (SE), which lasted 90 minutes; this group was sacrificed 1 hour after SE. Another two groups of rats (early and late epileptic) were kept under normal conditions after SE generation until their sacrifice. Both groups were video-monitored for 8:00 am to 6:00 pm to evaluate behavioral seizures; the early epileptic group was sacrificed on 10 day after the SE and the late epileptic group on day 56. To evaluate whether the effect of levetiracetam depends on SV2A levels, on another group the same procedure as for the late epileptic group was performed, but on day 49, osmotic pumps were implanted which released levetiracetam (260 mg/kg s.c.) for a week; they were sacrificed on day 56. The brain of all animals was obtained; SV2A protein expression was assessed by immunohistochemistry in 10 layers of the hippocampus. SV2A protein levels were increased mainly in somatic layers, associated with the GABAergic system during SE. In late epilepsy, SV2A protein levels increased in layers with axo-dendritic connections and no relationship to a particular neurotransmitter was found. On the other hand, after levetiracetam treatment the rats were divided into two groups, those that responded and those that did not. Although there was great variability in

SV2A levels in late epilepsy, animals with lower SV2A immunoreactivity did not respond to treatment with the antiepileptic drug.

1. ANTECEDENTES

1.1 EPILEPSIA

1.1.1 Definición

La epilepsia es uno de los desórdenes neurológicos crónicos más comunes a nivel mundial, se estima que en el mundo hay 50 millones de personas con este trastorno de acuerdo con la Organización Mundial de la salud (OMS). En México, entre 349-680 por cada 100 000 habitantes presenta diagnóstico de epilepsia (Cruz-Cruz *et al.*, 2017). La epilepsia es una enfermedad del cerebro caracterizada por una predisposición a generar crisis epilépticas de manera recurrente, las cuales se manifiestan como una interrupción temporal de la función cerebral normal y generalmente se deben a descargas eléctricas excesivas de redes neuronales corticales y subcorticales, lo que conlleva a consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales propias de esta condición (Yustalzuierdo, 2005; Stafstrom, 2010; Fisher *et al.*, 2014).

Cabe hacer hincapié en que la generación de una crisis convulsiva aislada o aguda en respuesta a una alteración o pérdida de la homeostasis cerebral no se considera epilepsia, ya que esta última es un evento crónico formado por un foco epileptógeno presente en el cerebro el cual es capaz de generar actividad neuronal exacerbada (López-Meraz *et al.*, 2009); por lo tanto, la epilepsia se define por la aparición de dos o más crisis epilépticas no provocadas en un periodo mayor a 24 horas o por la presencia de un síndrome epiléptico, el cual se refiere a un conjunto de características (tipo de crisis, registro electroencefalográfico, estudios de imagen) que ocurren de manera conjunta y tiene rasgos distintivos como edad de inicio y remisión, factor desencadenante de la crisis, variación diurna y comorbilidades (Fisher *et al.*, 2014; OMS, 2017).

La epilepsia no necesariamente se encuentra presente a lo largo de toda la vida; se considera resuelta cuando una persona ha estado libre de crisis durante los últimos 10 años con al menos los últimos 5 años sin fármacos antiepilépticos o cuando la persona ha pasado la edad propia del síndrome epiléptico (Fisher *et al.*, 2014).

1.1.2 Clasificación

La clasificación de la epilepsia depende del tipo de crisis que presente el paciente (ver sección 1.1.3). En términos generales las crisis se dividen en crisis de inicio focal, inicio generalizado y origen desconocido, con base en ello, la epilepsia puede clasificarse en (Scheffer *et al.*, 2017; Figura 1):

- Epilepsia focal. Las crisis epilépticas del paciente son de origen focal; el registro electroencefalográfico interictal (intervalo de tiempo comprendido entre dos crisis)

del paciente muestra descargas epileptiformes focales (ver sección 1.1.4); el diagnóstico se realiza sobre fundamentos clínicos apoyados por hallazgos encontrados en el electroencefalograma (EEG). Este tipo de epilepsia envuelve desórdenes unifocales y multifocales, así como crisis que involucran un hemisferio; siendo estas, crisis focales sin pérdida de la consciencia, crisis focales con pérdida de la consciencia, crisis focales motoras, crisis focales no motoras y crisis tónico-clónicas de origen focal a bilateral.

- Epilepsia generalizada. Las crisis epilépticas del paciente son de origen generalizado observándose en el EEG una actividad generalizada en punta-onda; el diagnóstico se realiza sobre fundamentos clínicos apoyado por hallazgos de descargas típicas interictales encontradas en el EEG. Las crisis típicas de este tipo de epilepsia son las crisis de ausencia, mioclónicas, atónicas, tónicas y tónico-clónicas.
- Epilepsia combinada. Los pacientes muestran ambos tipos de crisis, tanto de inicio focal como generalizado. Como se mencionó de manera previa en epilepsias focales y generalizadas, el diagnóstico de este tipo de epilepsias también se realiza sobre fundamentos clínicos apoyado por hallazgos encontrados en el registro electroencefalográfico. El EEG interictal puede mostrar descargas epileptiformes focales y puntas-ondas generalizadas. Un ejemplo es el síndrome de Dravet y síndrome de Lennox-Gastaut.
- Epilepsia de origen desconocido. Se usa para denotar que el paciente tiene epilepsia, pero no se puede determinar si el inicio de la crisis epiléptica es de origen focal o generalizado.

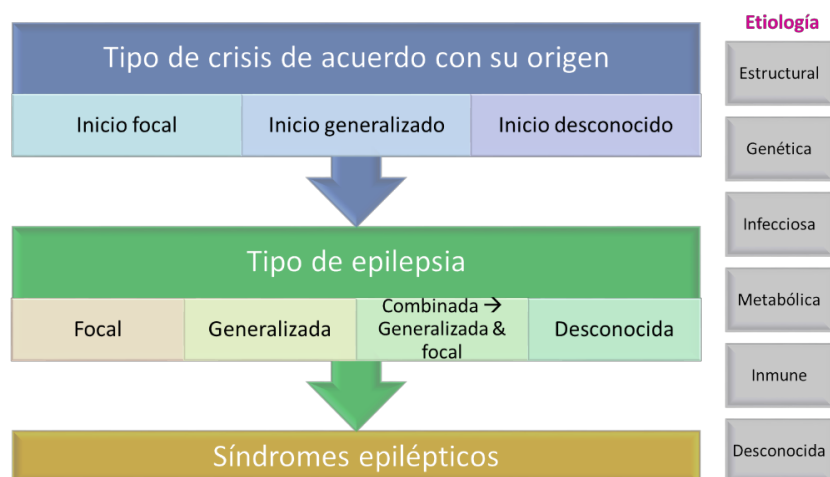


Figura 1. Clasificación de la epilepsia. La clasificación de la epilepsia se puede determinar a través de 3 niveles, y esto dependerá de los recursos disponibles para el clínico. En algunas circunstancias solo se podrá diagnosticar el tipo de epilepsia por el tipo de crisis que presente el paciente (primer nivel), mientras que en otras condiciones, los dos niveles siguientes se pueden

evaluar con estudios de imagen y EEG. En el diagnóstico de epilepsia focal, el paciente muestra de manera típica crisis con inicio focal, mientras que para el diagnóstico de epilepsia generalizada las crisis son de origen generalizado; en las epilepsias combinadas los pacientes muestran crisis de inicio focal y generalizado y en las epilepsias desconocidas es difícil determinar el tipo de crisis que presenta el paciente. El tercer nivel corresponde al diagnóstico del síndrome epiléptico, el cual se refiere a características que tienden a ocurrir en conjunto, tales como edad de inicio y remisión, tipo de crisis y su desencadenante, EEG. Otro factor importante en el diagnóstico de la epilepsia es su etiología, la cual se define como el estudio de la causalidad de la enfermedad y ésta, puede ser de origen estructural, genético, infeccioso, metabólico, inmune o desconocida. Modificado de Scheffer et al., 2017.

1.1.3 Crisis epilépticas

Las crisis epilépticas son la manifestación clínica de la epilepsia y se definen como una interrupción temporal de las funciones cerebrales debido a una excesiva actividad eléctrica neuronal (Stafstrom, 2004, 2010; Friedman & Sharieff, 2006; López-Meraz *et al.*, 2009; Fisher *et al.*, 2014) que a nivel celular presenta dos características: hiperexcitabilidad e hipersincronía. La hiperexcitabilidad es una respuesta exacerbada de una neurona ante un estímulo o entrada excitadora, en donde dicha célula tiende a disparar múltiples ráfagas de potenciales de acción en lugar de uno o dos; por su parte, la hipersincronía es el reclutamiento de un gran número de neuronas que se encuentran hiperexcitadas, es decir, neuronas disparando múltiples potenciales de acción al mismo tiempo (Stafstrom, 2004, 2010).

1.1.3.1 Clasificación de las crisis epilépticas

Las crisis epilépticas se evalúan por sus manifestaciones clínicas y por los trazos observados en el EEG durante la fase ictal (crisis *per se*) e interictal. Su clasificación se da de acuerdo con el inicio de la crisis (Panayiotopoulos, 2011; Fisher, 2017; Falco-Walter *et al.*, 2018; Tabla 1):

- Inicio focal. Su origen se limita a circuitos localizados en un hemisferio y la actividad epileptiforme puede o no propagarse hacia el otro hemisferio.
- Inicio generalizado (crisis convulsivas y no convulsivas). Se originan en un punto y de manera rápida se comprometen redes o circuitos distribuidos de manera bilateral.
- Inicio desconocido.

Tabla 1. Clasificación de las crisis epilépticas

INICIO FOCAL	INICIO GENERALIZADO	INICIO DESCONOCIDO
Sin pérdida de la consciencia	Con signos motores Tónico-clónico Clónico Tónico-clónico Mioclónico Mioclónico-tónico-clónico Mioclónico-atónico Atónico Espasmos epilépticos	Con signos motores Tónico-clónico Espasmos epilépticos
Con pérdida de la consciencia		Sin signos motores
Con signos motores		No clasificadas
Automatismos		
Atónica		
Clónica		
Espasmos epilépticos		
Hipercinética		
Mioclónica		
Tónica		
Sin signos motores	Sin signos motores (de ausencia)	
Autonómica	Típico	
Cognitivo	Atípico	
Emocional	Mioclónico	
Sensorial	Mioclónia del párpado	
Focal a tónico-clónico bilateral		

Modificado de Fisher, 2017 en Current Neurology and Neuroscience Reports 17: 48

1.1.4 Epilepsia del lóbulo temporal

La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es una de las epilepsias combinadas con crisis de origen focal más frecuentes, representando el 65 % de pacientes con este desorden (Guzmán-Jiménez & Velasco-Monroy, 2015). Se caracteriza por la presencia de actividad epileptiforme originada en estructuras del lóbulo temporal, principalmente el complejo amigdalino y la formación hipocámpica (Guzmán-Jiménez & Velasco-Monroy, 2015), siendo la alteración más frecuente la esclerosis hipocámpica (Özkara & Aronica, 2012).

La esclerosis hipocámpica se caracteriza por presentar un hipocampo atrofiado, gliosis y pérdida neuronal selectiva de las células piramidales del sector 1 y 3 del *Cornu Ammonis* (CA1 y CA3, de manera respectiva) e interneuronas del giro dentado (Özkara & Aronica, 2012; Thom, 2014; Guzmán-Jiménez & Velasco-Monroy, 2015). Además de esta condición, en tejido resecaado de pacientes con este trastorno se presenta dispersión de las neuronas granulares, es decir, la capa granular comienza a ensancharse debido a que las neuronas granulares comienzan a separarse mostrando una morfología elongada y fusiforme (Thom, 2014). Aunado a lo anterior, otra característica propia de la ELT es la reinervación (*sprouting*) de las fibras musgosas; de manera fisiológica los axones de las neuronas granulares, también llamados fibras musgosas, proyectan al CA3 y al hilus, pero durante la epilepsia estos axones forman autosinapsis colaterales o sinapsis asimétricas excitadoras con las dendritas de otras neuronas granulares, ocurriendo así una gran

reinervación axonal en la capa molecular del giro dentado, creándose un circuito excitador recurrente (Thom, 2014).

La ELT se asocia de manera general con un evento precipitante con potencial para generar crisis epilépticas (p. ej. *status epilepticus*, traumatismo craneoencefálico, evento hipóxico, tumor cerebral o infección cerebral), el cual antecede a un periodo libre de crisis denominado epileptogénesis, el cual finalmente desemboca en un periodo crónico distinguido por la presencia de crisis espontáneas recurrentes (DeFelipe Oroquieta *et al.*, 2002; Curia *et al.*, 2008; Blümcke, 2009; Scorza *et al.*, 2009).

En una condición epiléptica, el disparo neuronal paroxístico puede visualizarse a través del EEG; esto es posible debido a que un gran número de neuronas comienzan a disparar de manera simultánea, sumando así, las corrientes eléctricas individuales y generando variaciones bruscas de actividad eléctrica en el registro del EEG, a estas variaciones bruscas se les denomina espigas o descargas epileptiformes y su perfil electroencefalográfico se caracteriza por la frecuencia, amplitud y morfología de las mismas (Westbrook, 2000; Stafstrom, 2004).

Los grafoelementos del EEG utilizados en el análisis de la actividad anormal o patológica son la polaridad, frecuencia y amplitud de una onda. La frecuencia corresponde a los ciclos o veces que se repite una onda por segundo; la actividad eléctrica en condiciones basales y bajo ciertas condiciones presenta frecuencias o ritmos agrupados en bandas de frecuencia, las cuales se clasifican en delta (<4 Hercios o ciclos por segundo), theta (4-7 Hercios), alfa (8-13 Hercios) y beta (>14 Hercios). La amplitud de la onda es la cantidad de incremento en la altura de la misma, mientras que su polaridad corresponde a la deflexión hacia arriba o hacia abajo que presente ésta (Escotto-Córdova, 1999).

Con respecto a la epilepsia, las espigas epileptiformes son una guía para la localización del foco epileptógeno. Una descarga interictal epileptiforme se caracteriza por tener una actividad paroxística con la presencia de espigas destacándose del fondo, una duración de 20-70 ms por espiga y un cambio abrupto en la polaridad (Figura 2; Javidan, 2012).

El correlato intracelular de la espiga epileptiforme observada en el EEG es el desplazamiento despolarizante paroxístico (PDS, por sus siglas en inglés). Éste, es un cambio rápido en el potencial de membrana celular (despolarización) de gran duración (50-200 ms) y amplitud (20-40 mV), seguido por una ráfaga repetitiva de potenciales de acción montados sobre una meseta despolarizante y un prolongado periodo de hiperpolarización (Figura 2; Ure & Perassolo, 2000; Westbrook, 2000; Stafstrom, 2004, 2010). El PDS es la expresión amplificada de potenciales postsinápticos excitadores que probablemente resulta en la activación sincrónica de axones colaterales recurrentes (Ure & Perassolo, 2000). El PDS es un evento unicelular; sin embargo, el PDS de una neurona puede activar

despolarizaciones similares en neuronas contiguas, reclutando así de una manera rápida una red neuronal con disparos sincrónicos; si la excitación es excesiva o la inhibición se encuentra restringida, entonces el PDS puede dar lugar a una crisis convulsiva o descarga ictal (Ure & Perassolo, 2000; Stafstrom, 2004). El PDS es iniciado por receptores glutamatérgicos sensibles a ácido- α -metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y kainato, los cuales permiten una entrada rápida de iones Na^+ generando una despolarización que inducirá la posterior activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y finalmente la activación de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) que permitirán mantener una larga despolarización de la neurona. Después de la despolarización, la célula se hiperpolariza por la activación de receptores sensibles al ácido γ -aminobutírico (GABA) A y por los canales de K^+ y Ca^{2+} dependientes de voltaje (Westbrook, 2000; Stafstrom, 2010).

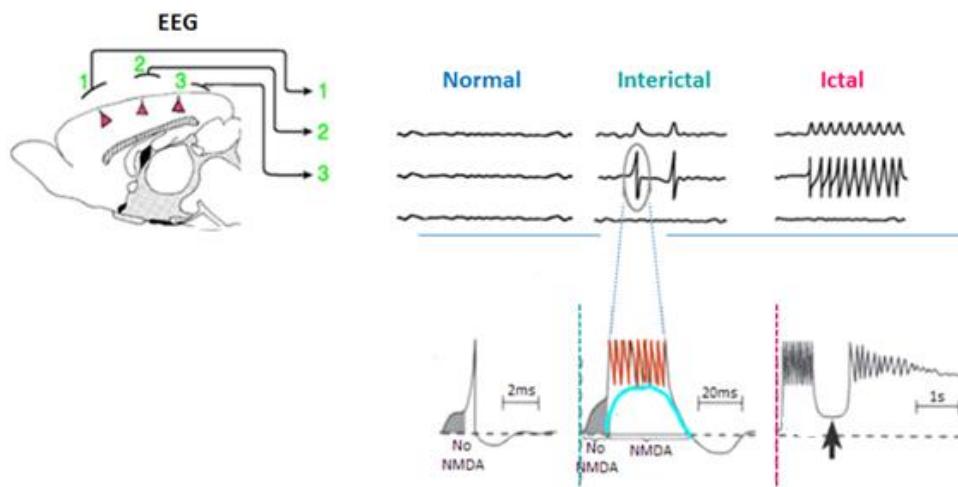


Figura 2. Correlato intracelular de la espiga epileptiforme. La imagen superior muestra la representación de la actividad eléctrica neuronal registrada a través de un EEG. En la columna que muestra la actividad eléctrica normal no se observa hipersincronía de redes neuronales, por lo tanto, no se encuentran espigas de gran amplitud o cambios bruscos en el registro. En la columna interictal, el electrodo 2 registra la actividad focal epileptógena, observándose espigas epileptiformes de gran amplitud y baja frecuencia, representando el disparo sincrónico de un gran número de neuronas hiperexcitables; dicha actividad se extiende hasta ser registrada por el electrodo 1, mientras que la población neuronal registrada por el electrodo 3 no se ha sincronizado con la red hiperexcitable. Durante la fase ictal (crisis convulsiva en sí), se propaga la actividad neuronal a zonas vecinas del foco epileptógeno y se observa un aumento en la frecuencia de las espigas interictales. En la imagen inferior se observa que la espiga epileptiforme se genera por una prolongada despolarización (curva turquesa), la cual es mantenida por la activación de los receptores NMDA; esta despolarización permite la generación de potenciales de acción en ráfaga (espigas rojas) montados sobre la meseta despolarizante. De manera paulatina la célula comienza a hiperpolarizarse por la activación de los receptores GABA A y por los canales de K^+ y Ca^{2+} dependientes de voltaje. Si la hiperpolarización falla, puede ocurrir una descarga ictal. Modificado de Westbrook, 2000 y Stafstrom, 2010.

La generación y propagación de la actividad epileptiforme depende de la región cerebral y de factores como la densidad celular, las propiedades intrínsecas de la membrana, el arreglo laminar neuronal y el patrón celular de interconexión (Stafstrom, 2010). Debido a

todas estas características, se ha considerado al hipocampo como una estructura con alta predisposición epileptógena, teniendo como característica principal un arreglo de conexiones sinápticas unidireccionales y glutamatérgicas, así mismo, las neuronas piramidales de CA3 presentan circuitos reverberantes altamente excitables; con respecto a las propiedades electrofisiológicas, las células piramidales hipocámpicas tienen un patrón de disparo de potenciales de acción en ráfaga, lo cual denota una actividad de alta frecuencia (>100 Hercios) que puede llegar a sincronizarse de manera rápida (Spruston & McBain, 2007).

1.2 MODELO ANIMAL DE EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL Y SU FISIOPATOLOGÍA

1.2.1 Modelo animal de ELT inducido con litio-pilocarpina

El modelo de ELT inducido con pilocarpina reproduce con alta fidelidad las características observadas en pacientes con este desorden neurológico. La administración sistémica de pilocarpina, un potente agonista muscarínico, promueve cambios morfoanatómicos y electrográficos en 3 periodos distintos: agudo, latente y crónico.

La fase aguda se caracteriza por la inducción del *status epilepticus* (SE), el cual se define como crisis continuas o intermitentes sin la recuperación completa entre crisis, por un tiempo mayor a 5 minutos; el inicio de la actividad excitadora que conducirá a la generación del SE, está asociado con la activación de receptores muscarínicos M1 presentes en el hipocampo, sin embargo, el mantenimiento de las descargas electrográficas se debe a la activación de receptores glutamatérgicos, los cuales también están involucrados en los procesos excitotóxicos que dan origen a la muerte neuronal propia de esta fase (Scorza *et al.*, 2009; Lorigados *et al.*, 2013). Esta grave pérdida neuronal se observa con mayor extensión en la región CA1 del hipocampo y neuronas hilares del giro dentado ($\approx 50\%$) y con menor gravedad en CA3 ($\approx 36\%$) (DeFelipe Oroquieta *et al.*, 2002; Curia *et al.*, 2008; Blümcke, 2009; López-Meraz *et al.*, 2009; Scorza *et al.*, 2009).

El periodo de epileptogénesis se caracteriza por la ausencia de crisis conductuales y porque durante este periodo se llevan a cabo los principales cambios morfo-anatómicos que darán comienzo a la fase crónica y al origen del foco epileptógeno (López-Meraz *et al.*, 2009; Scorza *et al.*, 2009). La pérdida neuronal originada durante la etapa aguda induce por un lado, la proliferación de células gliales (astrogliosis), y por otro lado, promueve la reorganización de redes neuronales que favorecen la sinaptogénesis, fenómeno que contribuye al aumento de la excitabilidad neuronal.

Uno de los principales mecanismos de reorganización sináptica durante esta etapa, es la reinervación de las fibras musgosas; la muerte de las neuronas piramidales del CA3, CA1

y de las interneuronas del giro dentado, deja sin contactos sinápticos a las neuronas granulares del giro dentado, por lo que los axones de estas últimas neuronas comienzan a establecer nuevos contactos sinápticos con neuronas granulares adyacentes, generando un proceso de reverberancia, el cual puede proveer un mecanismo de sincronización y amplificación de descargas eléctricas debido a una interacción excitadora glutamatérgica (De Felipe Oroquieta *et al.*, 2002; Curia *et al.*, 2008; Blümcke, 2009; López-Meraz *et al.*, 2009; Scorza *et al.*, 2009; Stafstrom, 2010).

Durante la fase crónica, ya se han consolidado todos los procesos que darán origen a la hipersincronía e hiperexcitabilidad neuronal. Dichos factores se reflejan en la aparición de espigas epileptiformes a nivel electroencefalográfico; además, el aumento en la frecuencia de estas espigas generará las crisis epilépticas (DeFelipe Oroquieta *et al.*, 2002; Curia *et al.*, 2008; Blümcke, 2009; Scorza *et al.*, 2009). La fase crónica presenta 3 momentos: interictal, ictal y post ictal.

El periodo interictal es el que transcurre entre crisis y crisis. Durante este estado, la actividad eléctrica exacerbada se limita al foco epileptógeno y se denota por la presencia de espigas interictales a nivel electroencefalográfico. En esta etapa las interneuronas GABAérgicas proporcionan un cerco inhibitorio a través de 2 vías, la inhibición anterógrada y por retroacción, las cuales impiden la propagación de la actividad eléctrica exacerbada. En la primera vía, una neurona excitadora aferente activa tanto a una interneurona inhibitoria como a otra neurona excitadora, así se suprime la actividad de otras vías excitadoras, mientras que la segunda vía corresponde a la inhibición por retroacción, el cual es un mecanismo autorregulador; una neurona excitadora activa una interneurona inhibitoria con retroacción sobre la propia neurona excitadora, reduciendo así la probabilidad de activación de esta célula (Westbrook, 2000).

El periodo ictal es la crisis epiléptica en sí. Durante esta fase la inhibición circundante es superada, la poshiperpolarización desaparece gradualmente en neuronas individuales por lo que se produce el reclutamiento de grupos neuronales vecinos a la zona de inicio de la crisis y de manera posterior puede llegar a involucrar ambos hemisferios. Se ha propuesto que la pérdida de células GABAérgicas con forma de candelabro generan una inhibición insuficiente por lo que son incapaces de controlar la hiperexcitabilidad neuronal (DeFelipe Oroquieta *et al.*, 2002). La mayoría de las crisis tienen una duración entre 1 y 2 minutos (Lado & Moshé, 2008).

El periodo postictal se presenta inmediatamente después de la crisis epiléptica y varía de minutos a días. A nivel neuronal los mecanismos involucrados en la terminación de la crisis incluyen a las corrientes de potasio activadas por calcio, pérdida de gradientes iónicos y el posible agotamiento de energía de sustratos locales (adenosín trifosfato), resultando en el

cese del disparo neuronal (Lado & Moshé, 2008). Mientras que los mecanismos que podrían limitar la transmisión sináptica es el agotamiento de las vesículas sinápticas, recaptura del neurotransmisor glutamato a través de la glía, sincronización de interneuronas inhibitoras y efectos inducidos por neuromoduladores (endocannabinoides, adenosina y neuropéptido Y; DeFelipe Oroquieta *et al.*, 2002; Lado & Moshé, 2008).

1.2.2 Hipocampo y Giro dentado

La formación hipocámpica está conformada por el giro dentado, hipocampo, subiculum, presubiculum, parasubiculum y la corteza entorrinal (Amaral & Lavenex, 2007; Andersen *et al.*, 2007; Stafstrom, 2010). El hipocampo y el giro dentado tienen una organización simple, conformada por una capa de células principales con un arreglo geométrico laminar (Amaral & Lavenex, 2007). El giro dentado se conforma por la capa molecular, granular e hilus, mientras que el hipocampo se divide en 3 subregiones (CA1, sector 2 del *Cornu Ammonis* y CA3), cada una de las cuales está formada por las capas piramidal, *stratum oriens*, *stratum radiatum*, *stratum lacunosum moleculare* que sólo se encuentra presente en CA1 y el *stratum lucidum* en CA3 (Figura 3).

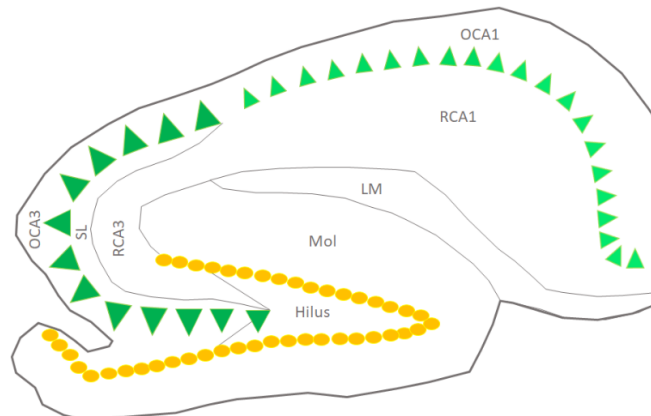


Figura 3. Giro dentado e hipocampo. El giro dentado se compone por la capa molecular, capa granular (representada por los círculos amarillos) e hilus, mientras que las regiones CA3 y CA1 del hipocampo están conformadas por el *stratum oriens*, *stratum radiatum*, capa piramidal (representada por los triángulos verdes), *stratum lucidum* y *stratum lacunosum moleculare*. Abreviaturas OCA1: *stratum oriens* de CA1, RCA1: *stratum radiatum* de CA1, LM: *stratum lacunosum moleculare*, OCA3: *stratum oriens* de CA3, RCA3: *stratum radiatum* de CA3, SL: *stratum lucidum*, Mol: capa molecular. La figura se realizó con el programa BioRender.

1.2.2.1 Circuito trisináptico

La conectividad en la formación hipocámpica comienza con la principal aferencia hacia el giro dentado, proveniente de las neuronas piramidales de la capa II de la corteza entorrinal; los axones de estas neuronas conforman la vía perforante, la cual establece sinapsis con las neuronas granulares del giro dentado e interneuronas de la misma región. El segundo

relevo le corresponde a los axones de las neuronas granulares, denominados fibras musgosas, los cuales realizan contactos sinápticos con las células hilares (interneuronas) del giro dentado y con las neuronas piramidales de la región CA3. A su vez, los axones de las neuronas piramidales de CA3 constituyen contactos sinápticos entre ellas mismas de manera ipsi y contra lateral (a través de la vía comisural de asociación), y con las neuronas piramidales de CA1 a través de las colaterales de Schaffer. Finalmente, los axones de las neuronas de CA1 tienen aferencias hacia el subiculum y la corteza entorrinal, cerrando de esta manera el circuito (Figura 4; Amaral & Lavenex, 2007; Taupin, 2007; Stafstrom, 2010; Olivares-Hernández *et al.*, 2015). Este circuito excitador, unidireccional y reverberante es la base de la sincronización neuronal en el hipocampo y de su alta predisposición a la generación de crisis epilépticas.

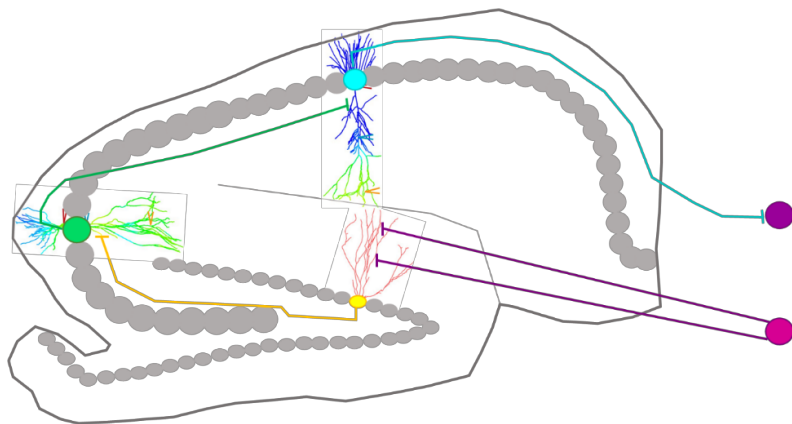


Figura 4. Circuito trisináptico. Los axones provenientes de las neuronas piramidales de la capa II de la corteza entorrinal (círculo rosa) forman la vía perforante, la cual se divide en lateral y medial; los axones provenientes de la porción lateral hacen contacto sináptico con las dendritas de las neuronas granulares (círculo amarillo) en el tercio externo de la capa molecular, mientras que la porción medial tiene aferencias hacia el tercio medial de la capa molecular. Los axones de las neuronas granulares inervan las dendritas basales de las neuronas piramidales de CA3 (círculo verde), mientras que los axones de estas últimas neuronas hacen contacto sináptico con las neuronas piramidales de CA1 (círculo turquesa) a través de las Colaterales de Schaffer. Finalmente, los axones de las neuronas piramidales de CA1 realizan contactos sinápticos con las neuronas piramidales de la capa VI (círculo morado) de la corteza entorrinal. La figura se realizó con el programa BioRender.

1.2.2.1.1 Giro dentado

Las neuronas granulares son las principales neuronas del giro dentado, localizadas en la capa granular. Miden $\sim 10 \mu\text{m}$, acomodadas en una forma densamente empaquetada, sin espacios para la presencia de células gliales entre ellas. Presentan un árbol dendrítico dirigido hacia la porción superficial de la capa molecular, llegando las dendritas distales a la fisura hipocámpica o a la superficie ventricular, habiendo 1.6 espinas/ μm en la cuchilla suprapiramidal con 5600 células, mientras que en la cuchilla infrapiramidal hay 1.3 espinas/ μm y 3640 células. El número total de neuronas granulares en el giro dentado de

la rata es de 1.2×10^6 ; la densidad celular es mayor en la zona septal que en la temporal (Amaral & Lavenex, 2007; Amaral *et al.*, 2007).

Las dendritas de las neuronas granulares son inervadas, de manera asimétrica, por los axones de las neuronas piramidales localizadas en la capa II de la corteza entorrinal y en menor grado por las células localizadas en la capa V y VI de la misma corteza. La vía perforante se divide en lateral y medial, terminando la primera en el tercio más superficial de la capa molecular, mientras que la medial termina en el tercio intermedio de la misma capa (Amaral & Lavenex, 2007; Amaral *et al.*, 2007).

Los botones axonales de las fibras musgosas, al pasar por la capa hilar, forman sinapsis con las dendritas proximales de las células musgosas; los axones colaterales granulares inervan de manera abundante las dendritas basales de las neuronas piramidales en forma de canasta y otras interneuronas presentes en el hilus del giro dentado; sin embargo, el contacto sináptico principal es hacia CA3. Los axones de las neuronas granulares terminan justo por debajo de la capa piramidal de CA3 (PCA3), capa denominada *stratum lucidum*; en la porción más proximal de CA3, las fibras musgosas se localizan por debajo y dentro de PCA3 (Figura 5). El principal neurotransmisor de las neuronas granulares es el glutamato, no obstante, también se ha reportado inmunorreactividad para el péptido opioide dinorfina y para GABA (Amaral & Lavenex, 2007; Amaral *et al.*, 2007).

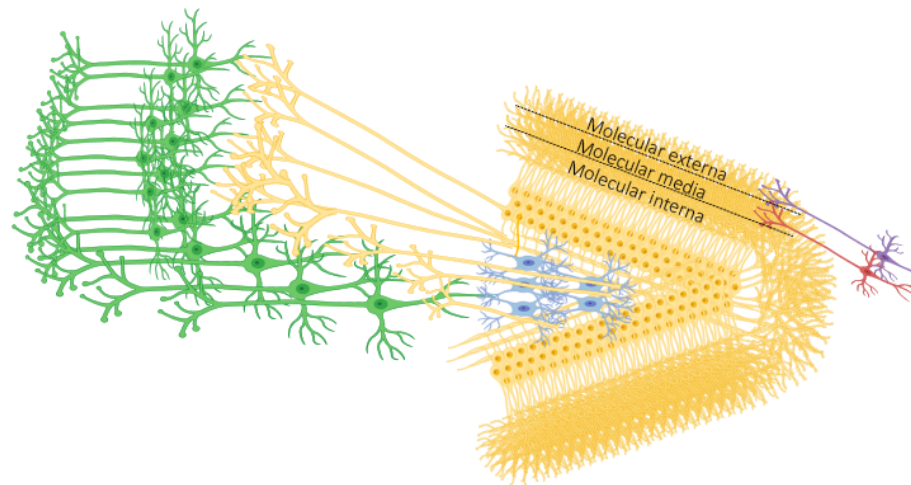


Figura 5. Contactos sinápticos de las neuronas granulares. Los axones provenientes de la vía perforante lateral (neuronas moradas) forman contactos sinápticos con las dendritas de las neuronas granulares (amarillas) en la capa molecular externa, mientras que los axones provenientes de la vía perforante medial terminan en la capa molecular media; las neuronas granulares inervan a las interneuronas hiliares (azules) y a las neuronas piramidales de CA3 (verdes). La figura se realizó con el programa BioRender.

Las neuronas piramidales en forma de canasta se localizan en la interfase de la capa granular e hilar, acuñadas ligeramente a la primera. Su soma mide 25-35 μm de diámetro, su axón forma densos plexos que rodean y forman sinapsis con el soma de las neuronas

granulares y en menor grado sobre los ejes dendríticos proximales de las dendritas apicales de las mismas neuronas granulares. Las neuronas piramidales en forma de canasta tienen una dendrita apical dentro de la capa molecular, lugar en donde se ramifica, y varias dendritas basales que se ramifican y extienden hacia la capa hilar (Figura 6). Forman contactos simétricos, siendo GABA su principal marcador bioquímico, por lo que son interneuronas inhibitoras (Amaral & Lavenex, 2007; Amaral *et al.*, 2007).

Las células musgosas se localizan en la capa hilar, tienen un diámetro de 25-35 μm . Tres o más dendritas se originan del cuerpo celular y se extienden dentro de la capa hilar, todas las dendritas proximales están cubiertas por complejas espinas denominadas excrescencias espinosas, lugar en donde terminan los axones de las neuronas granulares. Las células musgosas proyectan de manera ipsi y contralateral a la capa molecular interna del giro dentado (Figura 6); estas células son inmunorreactivas para glutamato, innervando neuronas granulares e interneuronas GABAérgicas (Amaral & Lavenex, 2007; Amaral *et al.*, 2007).

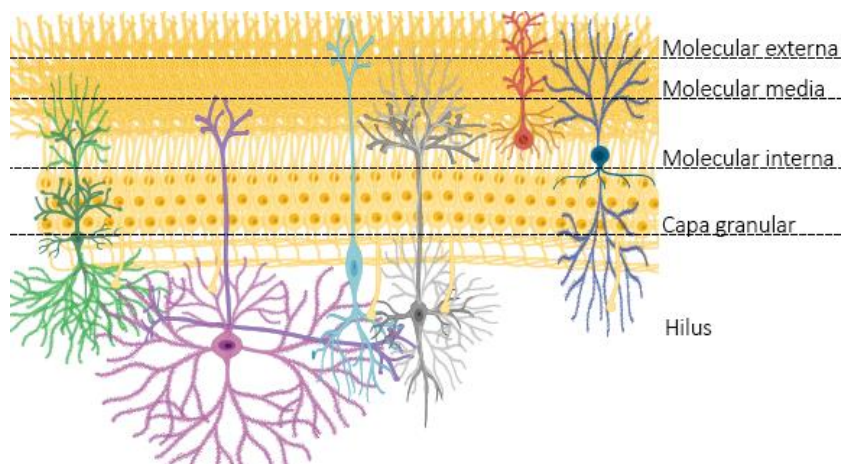


Figura 6. Interneuronas presentes en el giro dentado. Las neuronas piramidales en forma de canasta (verdes) se incrustan entre la capa granular e hilus, su axón inerva el soma de las neuronas granulares (amarillas) y sus dendritas abarcan la capa molecular interna y el hilus; el soma de las células musgosas (lilas) se localiza en el hilus, su axón abarca la capa molecular interna y el hilus, mientras que sus dendritas solo se encuentran en el hilus; las dendritas y el soma de las células HIPP (azul) se hallan en el hilus, mientras que el axón se limita a la capa molecular media y externa; el soma de las células HICAP (gris) se localiza en el hilus, su axón se extiende hacia la capa molecular interna y las dendritas se distribuyen en el hilus y en la capa molecular; el soma y las dendritas de las células MOPP (marrón) se encuentran confinados a la capa molecular y su axón se restringe a la capa molecular media y externa; el soma de las células en forma de candelabro (azul marino) se localiza en la interfase de la capa molecular y granular, el axón realiza contactos sinápticos con el segmento inicial del axón de las células granulares y las dendritas se distribuyen en la capa molecular y en el hilus. Abreviaturas HIPP: células hiliares asociadas con la vía perforante, HICAP: células hiliares relacionadas con la vía comisural de asociación, MOPP: células de la capa molecular asociadas con la vía perforante. La figura se realizó con el programa BioRender.

Las células HIPP (por sus siglas en inglés, células hiliares asociadas con la vía perforante) se localizan en la zona hilar, sus axones ascienden a los dos tercios externos de la capa

molecular realizando contactos simétricos e inhibidores sobre las dendritas de las neuronas granulares. Estas células HIPP reciben contactos sinápticos de las fibras musgosas, generándose así un circuito de retroalimentación local inhibitorio (Figura 6; Amaral & Lavenex, 2007; Amaral *et al.*, 2007).

Las células HICAP (por sus siglas en inglés, células hilares relacionadas con la vía comisural de asociación) se localizan en la capa hilar, tienen una morfología multipolar o triangular, sus dendritas se extienden hacia el hilus y la capa molecular, el axón se extiende a través de la capa granular y se ramifica de manera profusa en el tercio interno de la capa molecular (Figura 6; Amaral & Lavenex, 2007; Amaral *et al.*, 2007).

Las células MOPP (por sus siglas en inglés, células de la capa molecular asociadas con la vía perforante) se localizan en el fondo de la capa molecular, su axón produce una red larga limitada a los dos tercios externos de la capa molecular, mientras sus dendritas permanecen dentro de este estrato (Figura 6; Amaral & Lavenex, 2007; Amaral *et al.*, 2007).

Las células en forma de candelabro o axo-axónicas se localizan en la porción superficial de la capa granular; sus axones realizan contactos sinápticos simétricos sobre el segmento inicial del axón de las neuronas granulares, innervando así una sola célula a cerca de 1000 neuronas granulares. Las células en forma de candelabro son inmunorreactivas para GABA (Figura 6; Amaral & Lavenex, 2007; Amaral *et al.*, 2007).

1.2.2.1.2 Hipocampo o *Cornu Ammonis* (CA)

La principal capa celular en el hipocampo, tanto en la región CA3 como en CA1, está compuesta por neuronas piramidales, por debajo de ella se encuentra el *stratum oriens* de CA3 y CA1 (OCA3 y OCA1, de manera respectiva) y por encima de PCA3 pero no de la capa piramidal de CA1 (PCA1) se encuentra el *stratum lucidum*, en el cual se localizan los botones sinápticos de las fibras musgosas; finalmente el *stratum radiatum* (RCA3) se localiza por encima del *stratum lucidum* en CA3 y en CA1 (RCA1) de manera inmediata a la capa piramidal (Figura 3). En la región CA1, la capa más superficial es el *stratum lacunosum moleculare*, lugar donde terminan los axones de la corteza entorrinal (Amaral & Lavenex, 2007).

Las neuronas piramidales del CA3 tienen un diámetro de 20-30 μm y las de CA1 15 μm ; los árboles dendríticos de las neuronas piramidales del CA3 son muy heterogéneos mientras que los de las neuronas de CA1 son homogéneos (Amaral & Lavenex, 2007). En CA3, el árbol dendrítico basal ocupa el OCA3, mientras que las dendritas apicales se extienden hacia el RCA3. Las neuronas piramidales cercanas al giro dentado reciben entradas de las fibras musgosas en sus dendritas apicales y basales, mientras que las neuronas más distales sólo reciben información de esta vía a través de las dendritas

apicales. En el *stratum oriens* y el *radiatum* se llevan a cabo las conexiones de asociación de CA3-CA3 y las conexiones de las colaterales de Schaffer CA3-CA1 (Figura 7; Amaral & Lavenex, 2007).

Las interneuronas piramidales en forma de canasta se localizan en o cerca de PCA3 y PCA1, sus dendritas se extienden al *stratum oriens*, *stratum radiatum* y el *stratum lacunosum moleculare*, ésta última sólo en CA1. Las dendritas de estas interneuronas reciben sinapsis asimétricas y simétricas; las entradas excitadoras provienen de las neuronas piramidales y las aferencias inhibitorias proceden de otras interneuronas. Los axones inervan el soma y las dendritas proximales de las neuronas piramidales (Figura 7). Son interneuronas GABAérgicas (Amaral & Lavenex, 2007).

Las interneuronas en forma de candelabro o axo-axónicas se localizan en o cerca de PCA3 y PCA1, sus dendritas abarcan todos los estratos hipocámpicos. Sus axones viajan de forma superficial a la capa piramidal, entrando a ésta para hacer contacto sináptico con los axones proximales de las neuronas piramidales (Figura 7; Amaral & Lavenex, 2007).

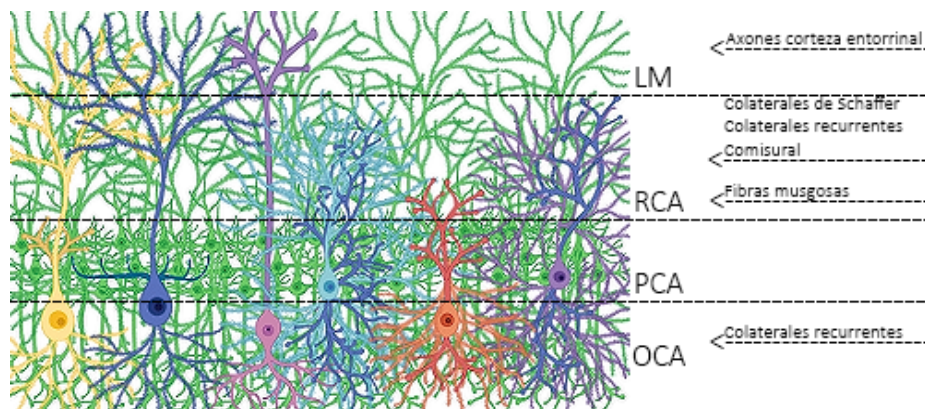


Figura 7. Interneuronas presentes en el hipocampo. Las interneuronas piramidales en forma de canasta (amarilla) y las interneuronas en forma de candelabro (azul oscuro) se localizan cerca de la capa piramidal, sus dendritas se extienden hacia todas las capas del hipocampo, mientras que su axón inerva los axones proximales y el soma de las neuronas piramidales (verde). El soma y las dendritas de las interneuronas *oriens-lacunosum-moleculare* (rosa) se sitúan en el *stratum oriens*, y su axón se encuentra confinado al *stratum lacunosum moleculare*. El soma de las neuronas trilaminar radiales (azul claro) se ubica en la capa piramidal, mientras que su axón y sus dendritas se localizan en todas las capas del hipocampo con excepción del *stratum lacunosum moleculare*. El soma y las dendritas de las neuronas trilaminar horizontales (roja) se restringen al *stratum oriens*, su axón abarca esta capa, la capa piramidal y la parte proximal del *stratum radiatum*. El soma de las neuronas bi-estratificadas (morada) se encuentra confinado a la capa piramidal, tanto el axón como las dendritas se distribuyen en el *stratum oriens* y *radiatum*. Abreviaturas LM: *stratum lacunosum moleculare*, RCA: *stratum radiatum*, PCA: capa piramidal, OCA: *stratum oriens*. La figura se realizó con el programa BioRender.

Las células del O-LM (*oriens-lacunosum-moleculare*), cuya principal característica es un axón muy ramificado confinado al *stratum lacunosum moleculare* y proveniente del *stratum oriens*, forman sinapsis simétricas con las dendritas apicales distales de las neuronas piramidales. Las dendritas y el soma de estas células se localizan en las zonas ocupadas

por las colaterales recurrentes de las células piramidales; en CA3 esto incluye todas las capas y en CA1 sólo incluye el OCA1. La mayoría de las aferencias neuronales hacia el O-LM son excitadoras y parecen surgir de las colaterales recurrentes de las neuronas piramidales, estas interneuronas inhiben la actividad de las mismas neuronas piramidales distales de una manera retroalimentativa (Figura 7; Amaral & Lavenex, 2007).

Las células bi-estratificadas se localizan cerca de la capa piramidal, tienen árboles dendríticos multipolares que no alcanzan el *stratum lacunosum moleculare*; su axón envía colaterales al *stratum oriens* y a la parte profunda del *stratum radiatum* en donde se forma una densa red que termina sobre las dendritas de las células piramidales. Sus dendritas se localizan en la zona de asociación en CA3 y en las colaterales de Schaffer, manteniendo una inhibición por retroacción y anterógrada (Figura 7; Amaral & Lavenex, 2007).

Otras interneuronas se localizan en el *stratum radiatum* y sus redes dendríticas multipolares o estrelladas se restringen a esta capa. Sus axones ramifican localmente en esta misma capa y terminan sobre las dendritas de las células piramidales (Amaral & Lavenex, 2007).

Otra importante población de interneuronas se localiza en el *stratum lacunosum moleculare* o en el borde entre esta capa y el RCA1. Su axón ramifica en el *stratum lacunosum moleculare* o en la porción superficial del RCA1, formando sinapsis simétricas sobre dendritas distales de células piramidales. Sus dendritas se extienden de manera horizontal sin entrar a la capa piramidal (Figura 7; Amaral & Lavenex, 2007). Todas las interneuronas del hipocampo son inmunopositivas para marcadores de la vía de síntesis y transporte de GABA (Amaral & Lavenex, 2007).

1.3 LEVETIRACETAM

1.3.1 Generalidades

Para el tratamiento de algunos desórdenes epilépticos, entre ellos la ELT, se ha utilizado de manera reciente un fármaco de segunda generación, el levetiracetam. Este fármaco (también llamado L059), una [S]- α -etil-2-oxo-pirrolidina acetamida (Figura 8), es un análogo del piracetam, un medicamento nootrópico indicado para insuficiencia cerebrovascular, deterioro cognitivo asociado con la edad y mioclonus, este último aún se encuentra en controversia (Löscher *et al.*, 2016). El levetiracetam es un fármaco antiepiléptico no relacionado químicamente con otros antiepilépticos, su fórmula es $C_8H_{14}N_2O_2$, su masa molecular es de 170.21 y es altamente soluble en agua (Carreño, 2007).

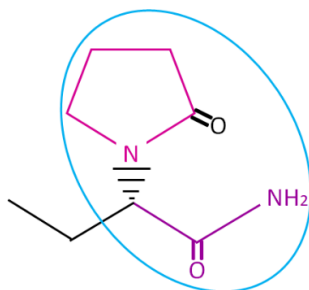


Figura 8. Estructura química del levetiracetam. El conjunto de la acetamida (estructura morada) y el anillo de pirrolidina (estructura rosa) conforman el piracetam (círculo azul). Al unirse este último con un grupo etilo se forma el levetiracetam.

El levetiracetam, a diferencia de otros fármacos antiepilépticos, no tuvo actividad anticonvulsiva en dos de las pruebas clásicas (electrochoque máximo y pentilenotetrazol) usadas como tamizaje inicial para probar nuevos fármacos antiepilépticos (Klitgaard, 2001; Benedetti *et al.*, 2004; Carreño, 2007; Löscher *et al.*, 2016); sin embargo, fue efectivo en la supresión de crisis parciales y secundariamente generalizadas en un modelo crónico de epilepsia, el *kindling* amigdalino (Löscher *et al.*, 2016).

Después de varias pruebas clínicas que confirmaron su eficacia y seguridad, el levetiracetam fue aprobado por la FDA (*US Food and Drug Administration*) en 1999, comenzando a prescribirse como un fármaco de nueva generación contra la epilepsia (Löscher *et al.*, 2016). En la actualidad, se usa como monoterapia o terapia adyuvante en el tratamiento de epilepsias primariamente generalizadas con crisis tónico-clónicas, crisis mioclónicas, epilepsia mioclónica juvenil y crisis de origen focal con o sin generalización secundaria (Swaroop *et al.*, 2013; Lévesque *et al.*, 2015).

Se ha postulado que el levetiracetam tiene un novedoso mecanismo de acción a través de la proteína de vesículas sinápticas 2A (SV2A), debido a su inusual perfil preclínico y se ha reportado que no actúa a través de los mecanismos tradicionales de otros fármacos antiepilépticos como inhibición de canales de Na^+ o modulación de corrientes de Ca^{2+} y tampoco tiene alta afinidad por receptores a GABA o glutamato (Carreño, 2007; Ulloa *et al.*, 2009).

1.3.2 Principal mecanismo de acción del levetiracetam a través de la SV2A

Para determinar el blanco terapéutico del levetiracetam se evaluó su afinidad a sitios de unión de otros fármacos antiepilépticos, siendo poco afín para ellos (Noyer *et al.*, 1995). En ensayos de unión, el levetiracetam reconoció una población homogénea de sitios de unión en el hipocampo de rata, siendo ésta altamente estereoselectiva, dado que el ucb L060, el D-estereoisomero del levetiracetam, fue 1000 veces menos potente que el

levetiracetam en inhibir la unión del radioligando (Noyer *et al.*, 1995); además el sitio de unión del levetiracetam fue único para el cerebro, con una alta presencia en membranas sinápticas y observándose la unión en todas las regiones probadas: hipocampo, corteza y cerebelo (Noyer *et al.*, 1995). A través de fraccionamiento subcelular, se identificó que el sitio de unión del levetiracetam estuvo presente en sinaptosomas y enriquecido en fracciones de vesículas sinápticas (Fuks *et al.*, 2003). Finalmente, se concluyó que el sitio de unión del levetiracetam es una proteína con un peso molecular de 90 kDa (Fuks *et al.*, 2003) y en el 2004 se descubrió que esta proteína es la SV2A (Lynch *et al.*, 2004). A pesar de que no se conoce con exactitud el sitio de unión del levetiracetam y la SV2A, se han propuesto varios aminoácidos esenciales para su acoplamiento (Figura 9; Correa-Basurto *et al.*, 2015)

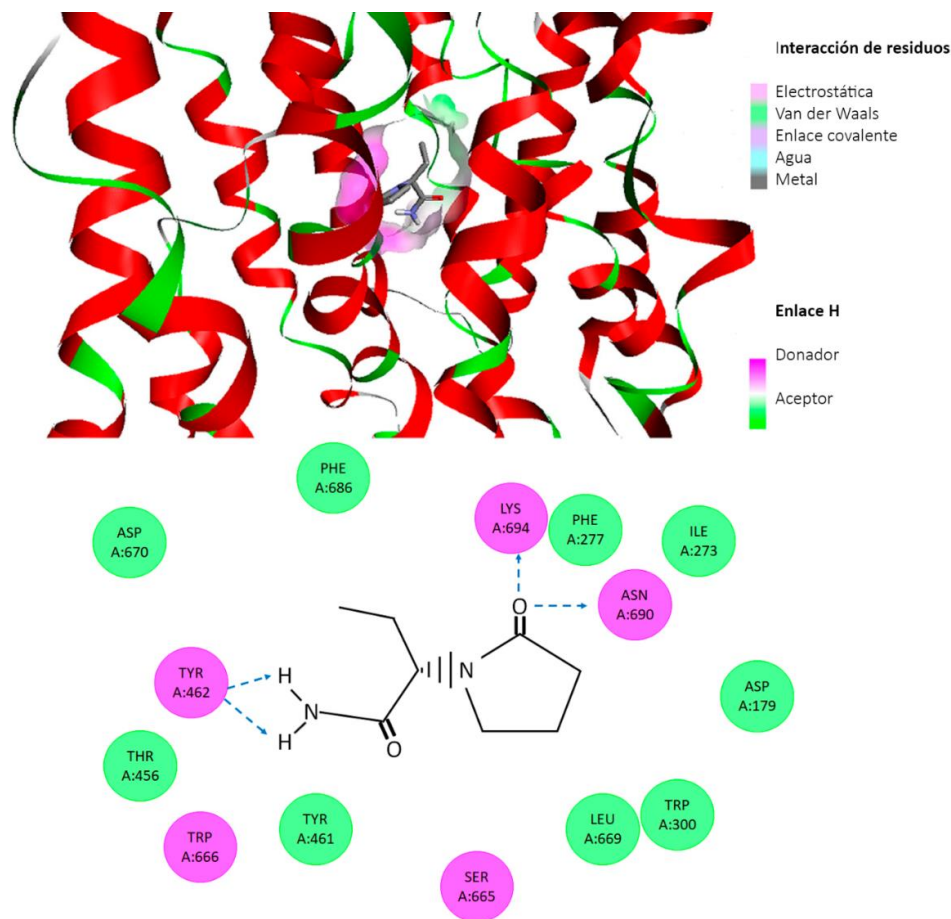


Figura 9. Sitios de unión putativos entre la SV2A y el levetiracetam. En la imagen superior se representa la unión del levetiracetam y la SV2A en los dominios transmembranales 7, 10 y 11. Las tonalidades que rodean al levetiracetam indican el tipo de interacción química entre el residuo (aminoácido específico) y el fármaco. La imagen inferior muestra los aminoácidos involucrados en la unión del levetiracetam y la SV2A, habiendo una preferencia por treonina 456, triptófano 666, serina 665, ácido aspártico 670 y leucina 689. La A representa la ubicación del aminoácido en la cadena proteica. Abreviaturas SV2A: proteína de vesículas sinápticas 2A, H: hidrógeno, PHE: fenilalanina, LYS: lisina, ILE: isoleucina, ASN: asparagina, ASP: ácido aspártico, TRP: triptófano, LEU: leucina, SER: serina, TYR: tirosina, THR: treonina. Modificado de Correa-Basurto *et al.*, 2015 en *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9: 125.

Debido a que el levetiracetam es hidrofílico, se requiere de su ingreso intracelular para ejercer su efecto (Yang *et al.*, 2007). Estudios electrofisiológicos reportaron que el levetiracetam disminuye la liberación vesicular dependiente de tiempo, dosis y estimulación eléctrica (Yang *et al.*, 2007; Meehan *et al.*, 2011, 2012; Mendoza-Torreblanca *et al.*, 2013; Klitgaard *et al.*, 2016). Se ha postulado que el levetiracetam ingresa a la neurona a través del proceso de endocitosis, uniéndose así a la porción transmembranal de la SV2A en donde actúa para reducir el conjunto de vesículas fácilmente liberable, lo cual se observa como una disminución en la amplitud de las corrientes postsinápticas excitadoras; finalmente, el levetiracetam es liberado durante la fusión vesicular o exocitosis (Figura 10; Yang *et al.*, 2007; Meehan *et al.*, 2011, 2012; Mendoza-Torreblanca *et al.*, 2013).

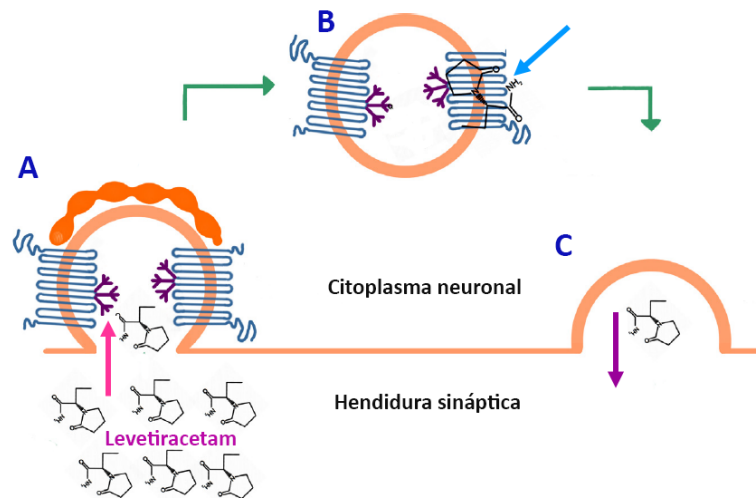


Figura 10. Propuesta del mecanismo de acción del levetiracetam. A) El levetiracetam ingresa a la vesícula sináptica (flecha rosa) durante el proceso de endocitosis. B) Se ha postulado que el levetiracetam se une a la SV2A en los dominios transmembranales 7, 10 y 11 (flecha azul); en este sitio ejerce su efecto disminuyendo la liberación de neurotransmisores. C) El fármaco es liberado de la vesícula sináptica durante el proceso de exocitosis (flecha morada). Modificado de Mendoza-Torreblanca *et al.*, 2013 en *European Journal of Neuroscience* 38 (11): 3529-3539

Por otro lado, de manera previa se ha reportado que en pacientes con epilepsia hay una gran variabilidad en la respuesta al tratamiento con levetiracetam, habiendo pacientes libres de crisis después de haber sido tratados con el fármaco, mientras que otro sector no responde al tratamiento (Lynch *et al.*, 2009). Se ha propuesto que variaciones genéticas en la secuencia de SV2A influyen en la unión al levetiracetam, causando una respuesta diferencial al fármaco, determinando así su eficacia; sin embargo, estudios recientes han reportado que variaciones genéticas en la proteína SV2A o polimorfismos comunes no interfieren con la respuesta al tratamiento (Lynch *et al.*, 2009; Dibbens *et al.*, 2012).

Otra posible explicación del por qué algunos pacientes no responden de manera favorable al tratamiento con levetiracetam, es debido a las modificaciones en la inmunorreactividad

de SV2A. En pacientes con gliomas cerebrales y epilepsia, sometidos a cirugía y posteriormente tratados con levetiracetam, se evaluó la inmunorreactividad de la proteína SV2A como predictor clínico de la respuesta al tratamiento, concluyendo que una elevada inmunorreactividad de la proteína aumenta las probabilidades de respuesta eficaz al tratamiento (de Groot *et al.*, 2011). En este mismo sentido, Glien *et al.* (2002) observó en un modelo animal de ELT una respuesta diferencial al tratamiento con levetiracetam, por lo que una eficacia del fármaco también podría estar asociado con diferencias en la expresión de SV2A en modelos animales.

1.4 PROTEÍNA DE VESÍCULAS SINÁPTICAS 2A, BLANCO TERAPÉUTICO DEL FÁRMACO ANTICONVULSIVO LEVETIRACETAM

1.4.1 Proteínas de vesículas sinápticas 2

La familia de proteínas de vesículas sinápticas 2 (SV2) se encuentra conformada por 3 isoformas: SV2A, SV2B y SV2C. Estas fueron identificadas por primera vez en vesículas sinápticas purificadas del órgano eléctrico del elasmobranquio *Discopyge ommata* (Buckley & Kelly 1985; Mendoza-Torreblanca *et al.*, 2013).

Las proteínas pertenecientes a la familia SV2 se encuentran conservadas en vertebrados; su expresión está ausente en los cuerpos neuronales pero muy “enriquecida” en las capas sinápticas (Bajjalieh *et al.*, 1994). La isoforma SV2A está presente en todas las neuronas del sistema nervioso central y periférico, así como en células endócrinas (adrenal, pituitaria y páncreas), pero no exócrinas (Buckley & Kelly 1985). La SV2A es una glicoproteína con un peso molecular de ≈ 82.6 kDa conformada por 742 aminoácidos, con 12 dominios transmembranales, un amino terminal, 3 sitios intraluminales glicosilados unidos a asparagina entre los dominios transmembranales 7 y 8, secuencias consenso para fosforilación por proteína cinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico, proteína cinasa C, y caseína quinasa están presentes en la región del amino terminal y el bucle localizado entre los dominios transmembranales 6 y 7, en el amino terminal que precede al primer dominio transmembranal se encuentran residuos ácidos sugiriendo un sitio de unión a calcio (Figura 11; Buckley & Kelly 1985; Feany *et al.*, 1992).

Con respecto a la homología con las proteínas pertenecientes a la familia SV2, la proteína SV2B es 65 % idéntica y 78 % similar a SV2A, observándose la mayor divergencia en el amino terminal, presentando SV2B un amino terminal corto (perdiendo los primeros 39 aminoácidos de SV2A); la segunda divergencia se encuentra entre el dominio transmembranal 7 y 8. La proteína SV2B está conformada por 682 aminoácidos con un

peso molecular de 77.5 kDa; presenta 12 dominios transmembranales y 3 sitios glicosilados (Bajjalieh *et al.*, 1993).

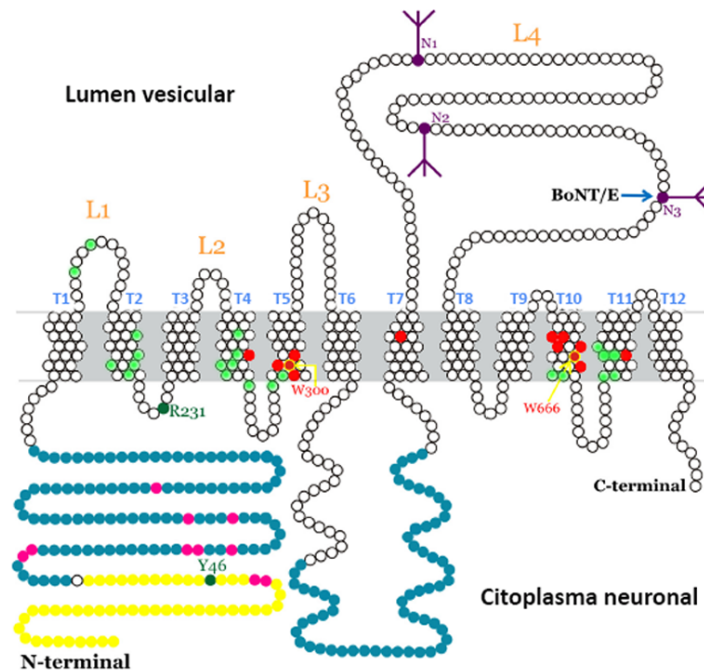


Figura 11. Representación de la proteína SV2A. La proteína SV2A está conformada por 742 aminoácidos, los primeros 57 aminoácidos del amino terminal corresponden al sitio de interacción con el dominio C2B de sinaptotagmina-1. El aminoácido tirosina en el sitio 46 (verde oscuro) se requiere para el tráfico de SV2A a vesículas sinápticas. El aminoácido arginina en el sitio 231 es un motivo canónico de la superfamilia de transportadores (verde). Los aminoácidos en color rosa representan 10 sitios de fosforilación putativos en el amino terminal, mientras que los aminoácidos en color azul muestran los sitios de unión putativos a adenosín trifosfato. Los aminoácidos morados indican 3 sitios putativos de glicosilación, los cuales son necesarios para el ingreso a la neurona de las neurotoxinas botulínicas A y E. Los aminoácidos propuestos para la unión a racetams se observan en rojo; de manera específica los aminoácidos implicados en la unión al levetiracetam se muestran en color verde limón. El triptófano en el sitio 300 y en el sitio 666 son esenciales para la función de SV2. La proteína tiene 12 dominios transmembranales, una larga asa citoplasmática, otra luminal y 3 dominios luminales adicionales. Abreviaturas SV2A: proteína de vesículas sinápticas 2A, Y: tirosina, R: arginina, W: triptófano, L: dominio luminal, N: sitios putativos de glicosilación, T: dominios transmembranales, BoNT/E: neurotoxina botulínica E, N-terminal: amino terminal. Modificado de Mendoza-Torreblanca *et al.*, 2013 en *European Journal of Neuroscience* 38 (11): 3529-3539; Bartholome *et al.*, 2017 en *Frontiers in molecular neuroscience* 10: 148.

En el cerebro, la SV2A se expresa de forma ubicua a través de él, con excepción del núcleo facial y el trigémino (Bajjalieh *et al.*, 1993, 1994). En el hipocampo la inmunorreactividad de SV2A muestra un patrón puntiforme alrededor del soma de las neuronas principales (granulares y piramidales; sinapsis axo-axónicas y axo-somáticas) y ausente en el cuerpo celular. En las capas del hipocampo donde la transmisión sináptica es axo-dendrítica (RCA3, RCA1, OCA3, OCA1, molecular, *stratum lacunosum moleculare*) la inmunorreactividad se observa difusa (Bajjalieh *et al.*, 1994; Toering *et al.*, 2009; van Vliet *et al.*, 2009).

La SV2A se expresa tanto en neuronas excitadoras como inhibitoras (Bajjalieh *et al.*, 1994; Grønborg *et al.*, 2010). En la corteza de rata el porcentaje de co-expresión entre SV2A y el transportador vesicular 1 para glutamato (VGLUT1) es de 81.7 %, de 41.1 % para el transportador vesicular 2 para glutamato (VGLUT2) y de 95.7 % para el transportador vesicular para GABA (VGAT; Bragina *et al.*, 2012). Con respecto al hipocampo, SV2A co-expresa con VGLUT1 y VGAT en donde terminan las fibras musgosas en el *stratum lucidum* de CA3, el mismo patrón de tinción se observa en la corteza cerebelar (Grønborg *et al.*, 2010).

La distribución de SV2B se observa a lo largo del cerebro, sin embargo, tiene una expresión más limitada, estando ausente en el giro dentado, el globus pallidus, el núcleo reticular del tálamo y la parte reticular de la sustancia nigra (Bajjalieh *et al.*, 1994). Mientras que SV2A se expresa en neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas, SV2B en el cerebelo se asoció de manera selectiva con vesículas glutamatérgicas (Bajjalieh *et al.*, 1994; Grønborg *et al.*, 2010), mientras que en el hipocampo presentó una tinción difusa en el neurópilo pero no fue detectable en las fibras musgosas (Grønborg *et al.*, 2010). SV2C colocaliza con vesículas GABAérgicas y glutamatérgicas, sin embargo, tiene preferencia por VGAT en la capa de células de Purkinje (Grønborg *et al.*, 2010).

1.4.2 Función de la proteína SV2A

Algunas neuronas expresan 2 isoformas de SV2 en la misma vesícula, por lo que se ha sugerido que las proteínas de esta familia realizan la misma función (Bajjalieh *et al.*, 1994). A pesar de que no se ha dilucidado por completo el papel exacto de la SV2A, se ha postulado que tiene participación en múltiples funciones: exocitosis dependiente de calcio, transportador de constituyentes vesiculares y la capacitación (*priming*) vesicular (Nowack *et al.*, 2010; Mendoza-Torreblanca *et al.*, 2013; Löscher *et al.*, 2016).

La base génica GenBank reveló que SV2A es una proteína homóloga de transportadores bacterianos (Bajjalieh *et al.*, 1992). La SV2 tiene una alta homología con varios miembros de la superfamilia de transportadores transmembranales; la región con mayor homología entre SV2 y la subfamilia de transportadores de azúcar se localiza en el amino terminal, mientras que el carboxilo terminal tiene mayor homología con los transportadores para neurotransmisores (Feany *et al.*, 1992). Estudios estructurales han mostrado que SV2A tiene dos estados conformacionales, soportando la idea de que SV2A es una proteína transportadora (Lynch *et al.*, 2008).

Por otro lado, existe evidencia de que podría contribuir a regular los niveles de calcio citoplásmico durante la estimulación repetitiva (Janz *et al.*, 1999); al modular un paso en la capacitación vesicular aumentando el conjunto fácilmente liberable y, por lo tanto, la

probabilidad de liberación, preparando así a las vesículas sinápticas para su fusión (modulador positivo de la transmisión sináptica; Custer *et al.*, 2006); finalmente se ha propuesto que sea un receptor de las proteínas adaptadoras de clatrina y con ello contribuye al tráfico de sinaptotagmina mediante la modulación de la endocitosis (Yao *et al.*, 2010).

1.4.3 SV2A y epilepsia

Alteraciones en la organización sináptica, podrían contribuir al desarrollo y progresión de actividad convulsiva (Toering *et al.*, 2009). El 100 % de ratones *Knock out* (KO) contra la proteína SV2A experimentan crisis motoras severas a partir de la segunda semana posnatal y todos ellos mueren entre el día post natal 12 y 23, mientras que sólo el 24 % de animales heterocigotos presentan crisis de manera espontánea (Crowder *et al.*, 1999; Janz *et al.*, 1999); sin embargo, los ratones heterocigotos que son sometidos a diversos modelos de crisis agudas (*kindling* amigdalino y corneal, kainato, pilocarpina, pentilentetrazol y modelo de 6 Hercios), son más susceptibles a presentar comportamiento convulsivo (Kaminski *et al.*, 2009).

Estudios previos realizados en pacientes farmacorresistentes han señalado una disminución de la proteína SV2A en el área epileptógena. Pacientes farmacorresistentes con ELT y gliosis (sin una pérdida neuronal considerable) mostraron un patrón de inmunorreactividad de SV2A similar al tejido control, mientras que en pacientes con esclerosis hipocámica y pacientes con una patología dual, la cual incluye displasia cortical focal y esclerosis hipocámpica, se observó una disminución de la proteína SV2A en el neurópilo del hipocampo, principalmente en áreas con pérdida neuronal y gliosis, siendo muy notable la región hilar, en donde se mostró una inmunorreactividad moderada alrededor del soma y las dendritas de las interneuronas (Toering *et al.*, 2009; van Vliet *et al.*, 2009; Crèvecoeur *et al.*, 2014). En la capa molecular interna del giro dentado se observó un incremento en los niveles de SV2A, probablemente debido a la reinervación de las fibras musgosas (Toering *et al.*, 2009; van Vliet *et al.*, 2009; Crèvecoeur *et al.*, 2014). La expresión de SV2A también se observó en neuronas residuales con prominente tinción perikarial (Toering *et al.*, 2009). Así mismo, los niveles de SV2A disminuyeron en neocorteza temporal anterior de pacientes con ELT (Feng *et al.*, 2009).

Por otro lado, en diversos modelos animales de ELT se ha evaluado la inmunorreactividad de la proteína SV2A, habiendo datos contradictorios. En un modelo animal de ELT inducido por estimulación tetánica del hipocampo, la cual generó un sostenido SE, se observó una disminución paulatina de los niveles de la proteína SV2A; desde la fase aguda (un día posterior a la inducción del SE) hubo una menor tinción en la capa molecular interna del

giro dentado así como el hilus, la cual progresó durante la epileptogénesis (una semana después de la inducción del SE) siendo más marcada durante la fase crónica (6-8 meses post SE). La inmunorreactividad de SV2A disminuyó a través de todas las capas del hipocampo, aumentando la pérdida de SV2A en el giro dentado, quedando pocas células hilares rodeadas por una intensa inmunorreactividad de SV2A (van Vliet *et al.*, 2009). Sin embargo, en modelos de *kindling* eléctrico y químico se observó un incremento de la inmunorreactividad de SV2A en el hipocampo de ratas epilépticas (Matveeva *et al.*, 2007; 2008; Ohno *et al.*, 2009).

La disminución en los niveles de la proteína SV2A podría afectar directamente la respuesta al tratamiento con levetiracetam. de Groot *et al.* (2011) observaron que en pacientes con gliomas y epilepsia había una relación directa entre la expresión de la proteína SV2A y la respuesta al levetiracetam, teniendo una respuesta favorable aquellos pacientes con mayor expresión de SV2A. Reportes previos evaluados en pacientes con diversos síndromes epilépticos y en un modelo animal de ELT, ambos tratados con levetiracetam, han mostrado que existe una respuesta diferencial al tratamiento (una disminución del 100 % en la frecuencia de las crisis o una nula disminución de las mismas (Glien *et al.*, 2002; Lynch *et al.*, 2009), siendo de interés que esta gran variabilidad podría estar asociada a cambios en la inmunorreactividad de SV2A.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La proteína SV2A es esencial para que se lleve a cabo la correcta neurotransmisión (Custer *et al.*, 2006), ya que la ausencia de ésta genera crisis graves y finalmente la muerte de ratones sometidos a la delección del gen que codifica para la proteína (Janz *et al.*, 1999); además, ratones heterocigotos también son más susceptibles a la generación de conductas convulsivas cuando son sometidos a modelos agudos de crisis (Kaminiski *et al.*, 2009). Por lo tanto, la disminución de la SV2A observada en algunos modelos animales de epilepsia podría ser un factor de predisposición en la generación de este trastorno neurológico. Sin embargo, a pesar de que se ha evaluado la inmunorreactividad de SV2A en diversos modelos animales de epilepsia, los datos no han sido concluyentes, habiendo modelos en los que se reporta una disminución en los niveles de la proteína, tal es el caso de modelos genéticos de epilepsia y el modelo de estimulación tetánica (van Vliet *et al.*, 2009; Hanaya *et al.*, 2012), mientras que modelos de *kindling* eléctrico y químico indican que hay un aumento en la expresión de SV2A (Matveeva *et al.*, 2007; Ohno *et al.*, 2009). Con respecto a este punto surge la interrogante de si los cambios en los niveles de la proteína son paulatinos y crónicos o estas modificaciones se dan de manera aguda y así permanecen a lo largo del trastorno neuronal. Además, dado que la proteína SV2A se

expresa en todas las vesículas sinápticas, resulta interesante conocer si los cambios ocurridos durante el proceso patológico inciden por igual en ambos sistemas, el excitador e inhibidor. Con respecto a este punto, hay escasa información del papel de la SV2A y el desbalance excitador-inhibidor observado durante la epilepsia. Finalmente, debido a que la SV2A es el blanco terapéutico del fármaco anticonvulsivo levetiracetam, cambios sutiles podrían ser cruciales en la respuesta al tratamiento con el fármaco, siendo de suma importancia clínica esta posible correlación.

Debido a las controversias detalladas con anterioridad en los diferentes modelos de epilepsia, el presente trabajo va dirigido a evaluar las variaciones en la inmunorreactividad de SV2A durante la generación de la epilepsia en uno de los modelos que reproduce con mayor fidelidad la fisiopatología de pacientes con ELT. Además, esta investigación evaluó la relación entre los principales sistemas excitador e inhibidor y su asociación con la SV2A durante el proceso de generación de la epilepsia. Finalmente, abordamos la relación entre las modificaciones de la inmunorreactividad de SV2A y la respuesta al tratamiento con levetiracetam.

3. JUSTIFICACIÓN

La ELT es una de las epilepsias con crisis de origen focal más frecuentes y también es la patología con mayor porcentaje de pacientes farmacorresistentes. Comprender los cambios en la proteína SV2A a lo largo de la generación de la epilepsia permitirá ampliar el conocimiento en la fisiopatología de este desorden neurológico. Además, la evaluación de la relación entre las modificaciones de la SV2A y la respuesta al tratamiento contribuirá a conocer el papel de la SV2A en la farmacorresistencia del levetiracetam, un aspecto de gran relevancia en el manejo clínico de los pacientes con ELT.

4. HIPÓTESIS

En el hipocampo de rata, la proteína SV2A disminuirá de manera progresiva durante la generación de la epilepsia y esta disminución afectará la respuesta al tratamiento con levetiracetam.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar la implicación de la proteína SV2A durante la epilepsia del lóbulo temporal y su asociación como factor de respuesta al tratamiento con levetiracetam

5.2 Objetivos particulares

Objetivo particular 1

Cuantificar los niveles de la proteína SV2A en el hipocampo de rata durante el progreso de la epilepsia (*status epilepticus*, epilepsia temprana y tardía) y su asociación con los sistemas excitador e inhibidor.

Objetivo particular 2

Correlacionar los niveles de SV2A de ratas epilépticas con el efecto del levetiracetam sobre las crisis espontáneas recurrentes.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

METODOLOGÍA PARA EL OBJETIVO PARTICULAR 1

Cuantificar los niveles de la proteína SV2A en el hipocampo de rata durante el progreso de la epilepsia (*status epilepticus*, epilepsia temprana y tardía) y su asociación con los sistemas excitador e inhibidor.

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso 250- 300 g provenientes de laboratorios Envigo (México). Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (20 ± 2 °C) y ciclo luz/oscuridad (6:00 am/6:00 pm, ciclo de luz) con comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos estuvieron de acuerdo con la guía NIH para el cuidado y uso de animales experimentales y la Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura (SAGARPA NOM-062-Z00-1999) publicada en 2001. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del

Instituto Nacional de Pediatría. Los sujetos de experimentación se asignaron al azar a los grupos experimentales.

Grupos experimentales

- a) Grupo *status epilepticus* (SE, n = 5). Se sometió a eutanasia 1 hora después de haber detenido el SE.
 - a.1. Grupo control del *status epilepticus* (Ctrl, n = 5). Se sometió a eutanasia con el grupo “a”.
- b) Grupo epiléptico temprano (EEPI, n = 5). Se sometió a eutanasia 10 días posteriores a la inducción del SE.
 - b.1. Grupo control epilepsia temprana (Ctrl, n = 5). Se sometió a eutanasia con el grupo “b”
- c) Grupo epiléptico tardío (LEPI, n = 6). Se sometió a eutanasia 56 días posteriores a la inducción del SE.
 - c.1. Grupo control epilepsia tardía (Ctrl, n = 4). Se sacrificó con el grupo “c”.

Inducción del *status epilepticus* y cuidados post SE

Con la finalidad de reducir la dosis de pilocarpina necesaria para inducir el SE, los grupos experimentales recibieron cloruro de litio (127 mg/kg, i.p.; Sigma-Aldrich) 19 horas previas a la administración de pilocarpina (Clifford *et al.*, 1987; Glien *et al.*, 2002; Curia *et al.*, 2008). Al día siguiente de la administración del cloruro de litio, los animales fueron tratados con bromuro de metil escopolamina (1 mg/kg, i.p.; Sigma-Aldrich) 30 minutos previos al tratamiento con pilocarpina, esto para contrarrestar los efectos periféricos colinérgicos generados por la pilocarpina. Finalmente se administró una dosis de pilocarpina hidroclicorada (30 mg/kg, i.p.; Sigma-Aldrich) para inducir el SE. Después de 90 minutos de iniciado el SE, éste se interrumpió con una inyección de diazepam (5 mg/kg, i.m.; PiSA) y, de manera inmediata, los animales se colocaron en una cama de hielo durante una hora para disminuir la hipertermia generada por las continuas crisis convulsivas. Al concluir este lapso, las ratas se regresaron a cajas individuales. Ocho horas después de la primera aplicación de diazepam, los animales recibieron una segunda dosis (5 mg/kg, i.m.), se hidrataron con 5 mL de cloruro de sodio (0.9 % s.c.) y se mantuvieron a 17 °C durante toda la noche. Al día siguiente, las ratas fueron regresadas a condiciones controladas de temperatura y luz/oscuridad. Los animales fueron alimentados durante 3 días con suplemento alimenticio nutricional hasta que comenzaron a comer *pellets* (Glien *et al.*, 2001).

Video monitoreo conductual de las crisis espontáneas recurrentes

Para evaluar la frecuencia de las crisis espontáneas recurrentes en los grupos epiléptico temprano y tardío se llevaron a cabo dos fases de video-monitoreo. Para detectar la aparición de la primera crisis espontánea y conformar el grupo epiléptico temprano, los animales se grabaron del día 4-10 post SE durante 24 horas (Figura 12). Nuestras observaciones durante la primera etapa de monitoreo conductual reflejaron una mayor frecuencia en la aparición de crisis durante el periodo diurno, por lo que decidimos acotar la ventana de tiempo para el video monitoreo de las 8:00 a las 18:00 horas del día 35-56 post SE; nuestros datos están en concordancia con Arida *et al.*, 1999 y Glien *et al.*, 2002. Para cuantificar el número de crisis que presentaron los animales epilépticos se evaluó su conducta de acuerdo con la escala de Racine, la cual establece 5 etapas: 1) movimientos faciales y de hocico, 2) clonus de cabeza, 3) clonus de miembros anteriores, 4) levantamientos, 5) levantamientos y caídas (Racine, 1972). Se consideró una crisis cuando los animales presentaron un comportamiento de 3 o más en la escala de Racine. Los videos fueron obtenidos con un sistema DVR (por sus siglas en inglés, Digital Video Recorder) con 4 cámaras (Steren modelo CCTV-970, por sus siglas en inglés, closed circuit television) y revisados de manera manual con el programa H.264 PlayBack para Windows. Los videos se observaron a una velocidad 4X (4 veces mayor a la velocidad normal) hasta detectar una crisis, una vez localizada la crisis conductual, la grabación fue detenida, regresada hasta el momento de inicio y observada a una velocidad normal (Glien *et al.*, 2001).

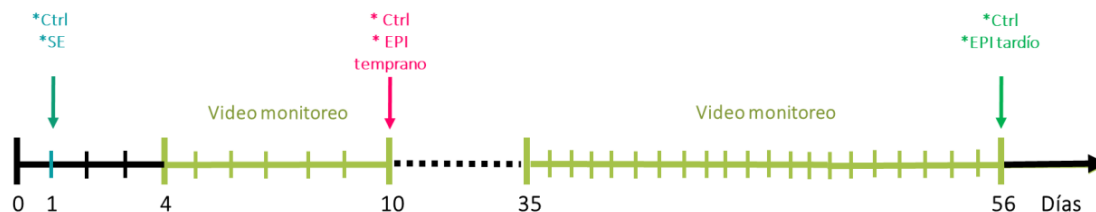


Figura 12. Diseño experimental para el objetivo particular 1. El día 1 se indujo el SE a ratas macho. Las ratas del grupo SE y sus controles se sometieron a eutanasia 60 minutos después de detener el SE con diazepam (flecha azul). Para evaluar la frecuencia de las crisis espontáneas se video monitoreó (línea verde olivo) la conducta de los animales de los grupos epilépticos durante el periodo diurno (8:00-18:00). El grupo epiléptico temprano fue video monitoreado del día 4 al 10 y sometido a eutanasia, junto con su control, el día 10 (flecha rosa). El grupo epiléptico tardío fue monitoreado del día 35-56 y sometido a eutanasia junto con su control este último día (flecha verde). Abreviaturas Ctrl: control, SE: status epilepticus, EPI: epiléptico.

Colecta del tejido cerebral

El día de la eutanasia todos los animales se anestesiaron de manera profunda con pentobarbital sódico (63 mg/mL, i.p.) y se perfundieron por vía intracardiaca con NaCl 0.9 % y posteriormente con paraformaldehído 4 % (preparado en amortiguador de fosfatos PB

0.1 M; pH 7.4). A continuación, las ratas se decapitaron, sus cerebros se removieron y post fijaron con paraformaldehído 4 % durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente, los cerebros se crioprotegieron por inmersión en un gradiente de sacarosa (20 y 30 %) hasta su completa impregnación. Al concluir el paso previo, el tejido se congeló con 2-metilbutano y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Finalmente, el hipocampo completo se cortó con un criostato (Cryocut 1800) en secciones seriadas sagitales (40 µm de grosor); el tejido se almacenó a -20 °C en solución crioprotectora hasta su uso.

Inmunohistoquímica

Todo el proceso de inmunohistoquímica se realizó por libre flotación de las secciones hipocámpicas con agitación continua y a temperatura ambiente. Ambos grupos, el control y el experimental fueron procesados al mismo tiempo y en las mismas condiciones para la detección de la inmunorreactividad de SV2A, VGAT y VGLUT1.

Para la detección de la proteína SV2A se usó PB 0.1 M durante todo el proceso, mientras que para el marcaje de VGAT y VGLUT1 se empleó amortiguador de fosfatos salino (PBS 0.1 M) para todas las reacciones con excepción del bloqueo y los anticuerpos, los cuales fueron diluidos en PBS Tween 0.1 %.

Para retirar la solución crioprotectora del tejido se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PB (preparado sin cloruro de sodio) o PBS (preparado con cloruro de sodio) respectivamente; el proceso inició con la incubación del tejido con peróxido de hidrógeno (3 % H₂O₂; Sigma-Aldrich) durante 30 minutos para SV2A y 15 minutos para VGAT y VGLUT1. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno. Después, las rebanadas se incubaron en suero fetal bovino (FCS, 5 % preparado en PB y PBS Tween; Gibco) por una hora. Al finalizar este periodo, el tejido se incubó durante toda la noche con los anticuerpos primarios diluidos en FCS: SV2A (1:500, cabra IgG, Santa Cruz, sc-11936), VGAT (1:1000, conejo IgG, Sigma, V5764) o VGLUT1 (1:1000, ratón IgG, Santa Cruz, sc-377425). Al día siguiente, las rebanadas fueron lavadas 3 veces durante 15 minutos cada uno y posteriormente incubadas durante 2 horas con sus respectivos anticuerpos secundarios biotinilados diluidos en FCS: caballo anti-cabra (1:1000, Vector, BA-9500), cabra anti-conejo (1:500, Vector, BA-1000) o cabra anti-ratón (1:500, Vector, BA-9200). Se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno y luego el tejido fue incubado con avidina-biotina peroxidasa (Vectastain ABC Elite Standard Kit, Vector PK-6100) por una hora. Nuevamente se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno; la marca fue revelada al incubar los cortes con 3,3'-diaminobencidina (DAB; Vector SK-4100), el tejido se colocó sobre laminillas gelatinizadas y se montaron con Cytoseal (Pichardo- Macías *et al.*, 2016).

Inmunofluorescencia

Con la finalidad de determinar la co-expresión de SV2A con VGAT o VGLUT1, se realizaron dobles marcajes por inmunofluorescencia.

Las rebanadas se lavaron 3 veces con PBS durante 10 minutos cada uno. Posteriormente se incubaron con peróxido de hidrógeno (3 % H₂O₂; Sigma-Aldrich) durante 15 minutos y se lavaron nuevamente 3 veces, la duración de cada lavado fue de 10 minutos. De manera posterior, los cortes se incubaron en FCS (5 % preparado en PBS Tween; Gibco) por una hora. Al término el tejido se incubó con los anticuerpos primarios diluidos en FCS: SV2A (ratón IgG, Santa Cruz, sc-376234) y VGAT (conejo IgG, Sigma, V5764) o SV2A (cabra IgG, Santa Cruz, sc-11936) y VGLUT1 (ratón IgG, Santa Cruz, sc-377425) durante toda la noche; todos los anticuerpos se usaron en una dilución 1:200 con excepción de VGLUT1, el cual fue usado 1:300. Al día siguiente, el tejido se lavó 3 veces durante 15 minutos cada uno y en seguida fueron incubados durante 2 horas en sus respectivos anticuerpos secundarios diluidos en FCS: burro anti-ratón Alexa 488 (Invitrogen, A-21202) y burro anti-conejo Alexa 555 (Invitrogen, A-31572) o pollo anti-cabra Alexa 594 (Invitrogen, A-21468) y burro anti-ratón Alexa 488 (Invitrogen, A-21202); todos los anticuerpos fueron usados en una dilución 1:500, las rebanadas se montaron sobre portaobjetos gelatinizados usando el medio de montaje DAKO.

Cuantificación de las proteínas SV2A, VGAT y VGLUT1

Para el análisis semi-cuantitativo de la inmunorreactividad de la proteína SV2A en todo el hipocampo, se escogieron de manera aleatoria una de cada 12 secciones de los cortes seriados por cada animal, analizándose 10 cortes en total. Por cada corte se obtuvo una fotomicrografía del hipocampo con un objetivo 4X; la intensidad de la inmunorreactividad fue analizada por densidad óptica usando el programa NIH ImageJ v1.43m, los valores fueron expresados como unidades de densidad óptica. Cada valor de densidad óptica se corrigió restando el valor de fondo de cada sección; se seleccionó el cuerpo caloso para obtener el valor de fondo, debido a que es una región en donde está ausente la SV2A.

La densidad óptica de la SV2A fue cuantificada en 3 porciones del hipocampo: dorsal anterior (bregma: de AP:-1.7; ML: 0.18; DV: -3.7 a AP: -2.1; ML: 2.62; DV: -3.6 mm), dorsal posterior (bregma: de AP:-2.6; ML: 2.9; DV: -4.0 a AP: -3.7; ML: 4.6; DV: -6.3 mm) y ventral (bregma: de AP:-4.3; ML: 2.9; DV: -8.7 a AP: -4.0; ML: 4.6; DV: -8.8 mm; Moser & Moser, 1998a, 1998b; Kjelstrup *et al.*, 2002; Paxinos & Watson, 2007). A su vez cada sección fue dividida en capas. Para el hipocampo dorsal anterior y posterior se identificaron el OCA1, OCA3, RCA1, RCA3, PCA1, PCA3, *stratum lacunosum moleculare*, molecular, granular e hilus. El hipocampo ventral se dividió en OCA3, RCA3, PCA3, molecular, granular e hilus

(Figura 13). Debido a que fue complicado separar el *stratum lucidum* de PCA3, ambas capas se analizaron juntas.

El análisis semi-cuantitativo de la inmunorreactividad de VGAT y VGLUT1 se realizó en las mismas condiciones mencionadas de manera previa, sin embargo, cabe señalar que sólo se cuantificó el hipocampo dorsal anterior en las capas en donde se observaron diferencias significativas en la cuantificación de la proteína SV2A.

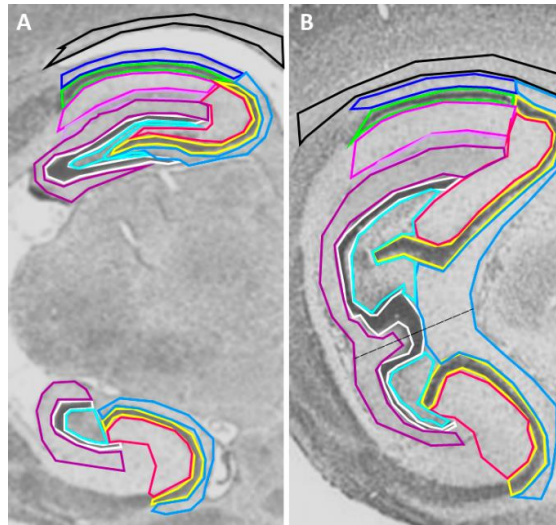


Figura 13. Capas analizadas del hipocampo dorsal anterior, posterior y ventral. Se muestran dos cortes sagitales, obtenidos en diferente nivel temporo-medial. A) Micrografía que muestra 10 capas analizadas en el hipocampo dorsal anterior y 6 capas analizadas en el hipocampo ventral. B) El hipocampo posterior se dividió a la mitad y la parte superior correspondió al hipocampo dorsal, mientras que la sección inferior se tomó como hipocampo ventral. Para ambos cortes, las capas corresponden a *stratum oriens* de CA1 (azul oscuro), *stratum oriens* de CA3 (azul claro), capa piramidal de CA1 (verde limón), capa piramidal de CA3 (amarillo), *stratum radiatum* de CA1 (rosa), *stratum radiatum* de CA3 (magenta), *stratum lacunosum moleculare* (lila), capa molecular (morado), capa granular (blanco), hilus (turquesa), finalmente se muestra en color negro el cuerpo calloso el cual fue utilizado para restar el fondo generado durante el proceso de inmunohistoquímica.

Análisis estadístico

La frecuencia de crisis espontáneas recurrentes se expresó como la media \pm error estándar de la media (SEM). Los datos de densidad óptica de la SV2A se representaron como la mediana \pm valores mínimos y máximos. Debido a que no hubo diferencias significativas entre los grupos controles de los grupos SE, epiléptico temprano y tardío, los valores de densidad óptica de SV2A fueron promediados y fijados al 100 % (representados como líneas punteadas en cada gráfica). Los datos de la densidad óptica de SV2A de cada grupo se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis (ANOVA de rangos de una vía) y las comparaciones múltiples se realizaron con el método de Dunn. Los valores de densidad óptica de VGAT y VGLUT1 se representaron como la media \pm SEM. Para comparar grupos equivalentes se utilizó la prueba t de Student. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente diferentes a una $p \leq 0.05$.

METODOLOGÍA PARA EL OBJETIVO PARTICULAR 2

Correlacionar los niveles de SV2A de ratas epilépticas con el efecto del levetiracetam sobre las crisis espontáneas recurrentes

Grupos experimentales

Para este objetivo, los grupos epilépticos sólo fueron tardíos (sacrificio día 56 posterior al SE; Figura 14). En este caso, las ratas Wistar se dividieron en los siguientes grupos experimentales:

- Grupo epiléptico responsivo al levetiracetam (EPI R, n = 3). Grupo epiléptico tratado con el fármaco anticonvulsivo levetiracetam durante 7 días y con una disminución mayor al 50 % de las crisis espontáneas recurrentes.
- Grupo epiléptico no responsivo al levetiracetam (EPI NR, n = 3). Grupo epiléptico tratado con el fármaco anticonvulsivo levetiracetam durante 7 días y con una disminución menor al 50 % de las crisis espontáneas recurrentes.
- Grupo control tratado con levetiracetam (Ctrl L, n = 7). Los animales recibieron tratamiento con levetiracetam durante 7 días sin la inducción del SE.
- Grupo control (Ctrl, n = 5). Animales tratados sólo con solución salina, sin el implante de la bomba osmótica.

Modelo animal de epilepsia

La inducción del SE, los cuidados post SE y el video monitoreo de las crisis conductuales se llevaron a cabo de acuerdo con el apartado "Metodología para el objetivo particular 1". Sin embargo, en este caso los grupos epilépticos tratados con levetiracetam fueron grabados del día 42-56 (una semana antes de administrar el fármaco) y durante el tratamiento (7 días) en el periodo diurno (8:00-18:00 horas; Figura 14).

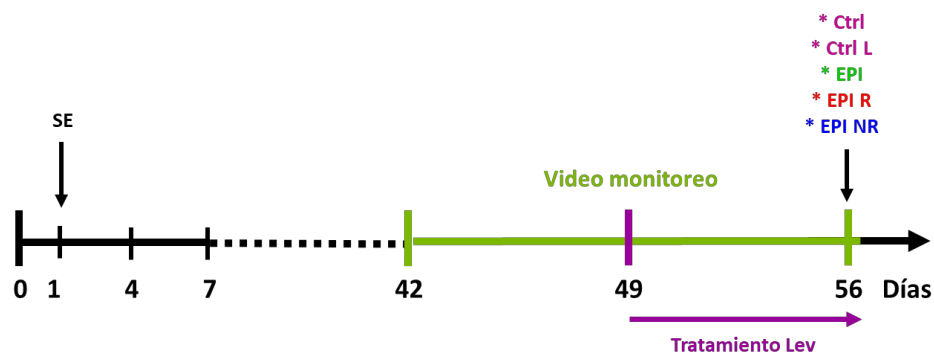


Figura 14. Diseño experimental. El día 1 se indujo el SE a ratas macho Wistar, los grupos controles se trataron con solución salina. Para evaluar las crisis conductuales, los grupos epilépticos se video-monitorearon una semana antes de administrar el levetiracetam y durante la semana del tratamiento (día 42-56 post SE; línea verde) de 8:00 a 18:00 horas. En el día 49 post SE (flecha morada), los grupos tratados con levetiracetam fueron implantados con una bomba osmótica para proveer una liberación continua del fármaco por una semana. Todos los animales se sacrificaron el día 56 post SE. Abreviaturas SE: *status epilepticus*, Ctrl: control, Ctrl L: grupo control tratado con levetiracetam, EPI: grupo epiléptico, EPI R: grupo epiléptico responsivo al levetiracetam, EPI NR: grupo epiléptico no responsivo al levetiracetam, Lev: levetiracetam.

Tratamiento con levetiracetam a través de bombas osmóticas

Los grupos tratados con levetiracetam se implantaron con una bomba osmótica (Alzet 2ML1) el día 49 post SE. El levetiracetam se preparó disolviendo 2 tabletas del fármaco (500 mg cada una; Ultra laboratorios México) en 3 mL de NaCl 0.9 %. La solución fue sonicada durante 10 minutos, centrifugada a $\sim 1960 \times g$ (Mikro 12-24, Hettich) durante 15 minutos y finalmente el sobrenadante se filtró para su uso (Corning® 0.45 μm).

De manera posterior, las bombas se llenaron con el fármaco ($\sim 330 \text{ mg/mL}$) y se incubaron en NaCl 0.9 % a 37 °C durante 5 horas (Manual ALZET). Cabe señalar que las bombas osmóticas utilizadas sólo permiten almacenar un volumen de 2 mL, por lo que la disolución final del fármaco fue de ($\sim 660 \text{ mg/2 mL}$). Al término de la incubación de las bombas, los animales se anestesiaron con isoflurano (Sofloran Vet, PiSA), utilizado al 5 % para la inducción de la anestesia y al 2-2.5 % para el mantenimiento, con un flujo de oxígeno de 1 mL/minuto. Cuando el animal no respondió al reflejo flexor se prosiguió a realizar una incisión a la altura de la escápula, generando una cavidad en donde se colocó la bomba osmótica de manera subcutánea y con el moderador de flujo apuntando hacia la parte caudal de la rata (Manual ALZET; Glien *et al.*, 2002). La herida se suturó y de manera tópica se administró cloruro de benzalconio (0.13 %, formulación en spray) y violeta de genciana (1:100). Al finalizar la cirugía, los animales recibieron antibiótico (Enrofloxacin, 5 mg/kg, i.m.) y una inyección aguda de levetiracetam (200 mg/kg, i.p.; solución inyectable Keppra; Glien *et al.*, 2002). Los animales se regresaron a cajas individuales hasta que se sometieron a eutanasia.

Niveles de levetiracetam en sangre

Para descartar que la diferencia en la respuesta al levetiracetam, entre el grupo epiléptico responsivo contra el grupo no responsivo, se debía a la ausencia o a una baja concentración del fármaco en el sistema, se midieron los niveles del levetiracetam en sangre los días 4 y 7 después de la implantación de la bomba osmótica. Se colectó una muestra de sangre (50 μL) de la vena caudal de los animales y el volumen obtenido se colocó sobre tarjetas Guthrie para tamiz neonatal (Whatman 903). El levetiracetam se

extrajo de las tarjetas Guthrie y fue analizado por HPLC (por sus siglas en inglés, cromatografía líquida de alta resolución) de acuerdo con el método publicado por Oláh *et al.* (2012).

Respuesta al tratamiento con levetiracetam

Los animales que presentaron sólo una crisis una semana antes del tratamiento fueron excluidos.

Para obtener el número de crisis por semana, se sumaron las crisis conductuales (con puntaje de 3 o superior a este de acuerdo con la escala de Racine) que ocurrieron la semana previa al tratamiento; el segundo conjunto de crisis consistió en la suma de las crisis conductuales acaecidas durante la semana del tratamiento.

Colecta del tejido cerebral, inmunohistoquímica y cuantificación de la proteína SV2A

Se realizó con el mismo método utilizado en el objetivo 1; sin embargo, sólo se detectó la inmunorreactividad de la proteína SV2A. Los anticuerpos se diluyeron en FCS: SV2A (1:500, ratón IgG, Santa Cruz, sc-376234) y el anticuerpo secundario biotinilado cabra anti-ratón (1:500, Vector, BA-9200). El análisis semi-cuantitativo de la densidad óptica de la SV2A sólo se efectuó en el hipocampo dorsal anterior.

Análisis estadístico

La frecuencia de las crisis espontáneas recurrentes y los niveles de levetiracetam en sangre se expresaron como la media \pm SEM. Los datos de densidad óptica de la SV2A se representaron como la mediana \pm valores mínimos y máximos. Los valores de densidad óptica se normalizaron y se tomó como el 100 % al grupo control y al grupo epiléptico (representados como líneas punteadas en cada gráfica). Los datos de la densidad óptica de SV2A de cada grupo se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis (ANOVA de rangos de una vía) y las comparaciones múltiples se realizaron con el método de Dunn. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a una $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

Status epilepticus

Establecimiento del *status epilepticus* y mortalidad

De acuerdo con nuestros resultados, el 100 % de los animales tratados con litio-pilocarpina presentaron alteraciones del comportamiento 10 minutos después de la administración de pilocarpina y llegaron al SE dentro de la primera hora después de la administración del fármaco. Con respecto a la mortalidad, el 14 % de los animales murió dentro de los primeros 15 días posteriores a la inducción del SE, a pesar de los cuidados mencionados con anterioridad. No obstante, esta tasa de mortalidad es inferior a la reportada por otros (Arida *et al.*, 1999; Curia *et al.*, 2008).

Análisis de las crisis espontáneas recurrentes en los grupos epilépticos

Del 86 % de los animales que sobrevivieron, el 76.2 % presentó al menos una crisis conductual durante su periodo de video monitoreo (del día 4-10 para el grupo epiléptico temprano; del día 35-56 para el grupo epiléptico tardío), mostrando un promedio de 5 ± 1.136 (media \pm SEM) crisis totales para ambos periodos, con un mínimo de una crisis y un máximo de 10 crisis por animal.

Con respecto al grupo EPI R el promedio de crisis en la semana previa al tratamiento correspondió a 6 ± 0.6 (media \pm SEM) y durante la semana de tratamiento fue de 1 ± 0.6 (media \pm SEM). El grupo EPI NR presentó en promedio 4.7 ± 1.2 (media \pm SEM) y 4 ± 0.6 (media \pm SEM) número de crisis antes y durante la administración del levetiracetam, de manera respectiva.

La mayor incidencia de las crisis espontáneas recurrentes se observó entre las 11:00 a.m. y las 2:00 p.m. Estos resultados son consistentes con reportes previos en donde se muestra una alta variabilidad en la frecuencia de crisis y la incidencia máxima de crisis durante el período de luz (Arida *et al.*, 1999; Glien *et al.*, 2001; Scorza *et al.*, 2009).

RESULTADOS PARA EL OBJETIVO PARTICULAR 1

Cuantificar los niveles de la proteína SV2A en el hipocampo de rata durante el progreso de la epilepsia (*status epilepticus*, epilepsia temprana y tardía) y su asociación con los sistemas excitador e inhibitor.

Inmunorreactividad de la proteína de vesículas sinápticas 2A

Inmunorreactividad de SV2A en animales control

La inmunorreactividad de SV2A mostró diferentes arreglos a lo largo de todas las capas del hipocampo debido a su organización laminar, resultando en un patrón de expresión

bien definido. En las capas en donde se localiza el soma de las neuronas principales (granular y piramidal) se observó una inmunorreactividad punteada perisomal, aunque ausente en el citoplasma celular (Figura 15 A). Por otro lado, en las capas en donde se establecen contactos sinápticos axo-dendríticos (RCA3, RCA1, OCA3, OCA1, molecular, *stratum lacunosum moleculare*) la inmunorreactividad es difusa, observándose solo un puntillero a lo largo de toda la capa (Figura 15 B). Con respecto a la región hilar, la inmunorreactividad presenta un arreglo diferente, pues la marca se observa como fibras que se extienden hasta el *stratum lucidum*, capa en donde se da el contacto sináptico entre las fibras musgosas y las neuronas piramidales de CA3 (Figura 15 C).

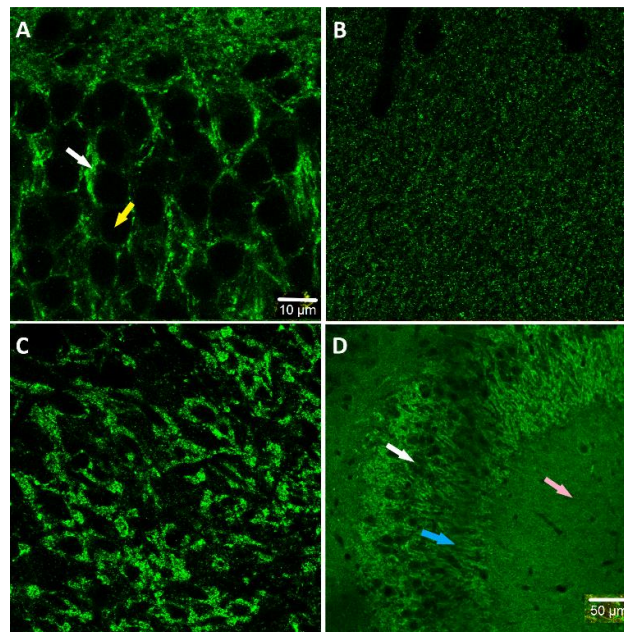


Figura 15. Fotomicrografía que muestra la inmunorreactividad de SV2A en el hipocampo de un animal control. La inmunorreactividad de SV2A se denota como el puntillero en color verde en todos los paneles mostrados. A) Inmunorreactividad de SV2A en capas somáticas; la figura muestra PCA1. Se observa una tinción punteada perisomática (flecha blanca) y ausente en el soma neuronal (flecha amarilla). B) La inmunorreactividad de SV2A en capas con sinapsis axo dendríticas es difusa, sólo se observa el patrón puntiforme; la figura muestra la capa molecular. C) En el hilus y en el stratum lucidum la inmunorreactividad de SV2A se observa como fibras; la figura muestra el stratum lucidum en conjunto con PCA3. D) Fotomicrografía en donde se observan los 3 patrones de inmunorreactividad mencionados. Capa con sinapsis axo somáticas (flecha blanca), capa con sinapsis axo dendríticas (flecha rosa) e inmunorreactividad en forma de fibras (flecha azul); la figura muestra la región de CA3. Abreviaturas SV2A: proteína de vesículas sinápticas 2A, PCA1: capa piramidal de CA1, PCA3: capa piramidal de CA3. La magnificación en los paneles A-C es de 100X y en el panel D es de 20X. La barra de escala en A-C corresponde a 10 μm y en D a 50 μm .

El hilus y el *stratum lucidum* son las capas que mostraron la mayor inmunorreactividad en contraste con la capa granular y el *stratum lacunosum moleculare*, las cuales tuvieron la menor inmunorreactividad, mientras que el resto de las capas tuvieron una tinción moderada (Figura 16).

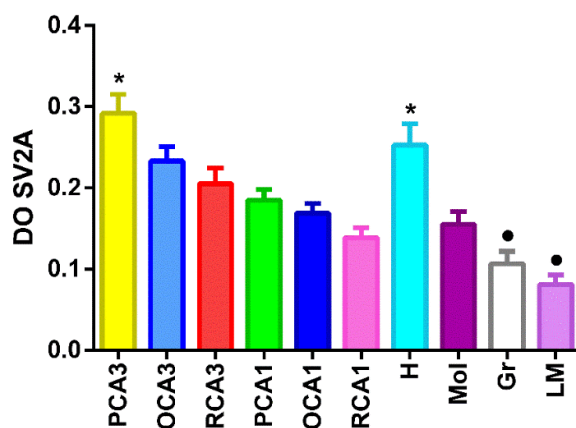


Figura 16. **Densidad óptica de SV2A en el hipocampo de un animal control.** La gráfica muestra la media + SEM de la densidad óptica de SV2A en un animal control en las 10 capas evaluadas. La mayor densidad óptica se observó en la capa piramidal de CA3 y en el hilus (*), mientras que las capas que presentaron menor densidad óptica fueron el stratum lacunosum moleculare y la capa granular (●). Abreviaturas DO: densidad óptica, SV2A: proteína de vesículas sinápticas 2A, PCA3: capa piramidal de CA3, OCA3: *stratum oriens* de CA3, RCA3: *stratum radiatum* de CA3, PCA1: capa piramidal de CA1, OCA1: *stratum oriens* de CA1, RCA1: *stratum radiatum* de CA1, H: hilus, Mol: capa molecular, Gr: capa granular, LM: *stratum lacunosum moleculare*.

En las secciones sagitales de la formación hipocámpica se observan cambios morfológicos a lo largo del eje temporo-medial. En la parte más medial, el giro dentado se observa como una V alargada de donde surge un medio círculo conformado por CA3 y CA1, conforme se avanza hacia la porción temporal, el giro dentado comienza a extenderse ventralmente ubicándose en la parte intermedia del eje dorso ventral. Así mismo, el CA3 dorsal se extiende hacia la parte ventral en donde conforma una "X" al unirse con la región de CA3 proveniente de la zona ventral. Finalmente, en la zona más temporal del hipocampo todas las regiones forman una media luna en donde ya no se distingue la forma "clásica" del giro dentado y CA3 (Figura 17). A pesar de los cambios morfológicos que se observan a lo largo del eje temporo-medial, la proteína SV2A no presenta cambios en su expresión, manteniendo la proporción de densidad óptica entre las capas que conforman el hipocampo dorsal anterior y el dorsal posterior, sin embargo, en el hipocampo ventral las proporciones de densidad óptica se desvanecen, es decir, la inmunorreactividad es muy semejante entre capas, sin mostrar cambios significativos con la región dorsal.

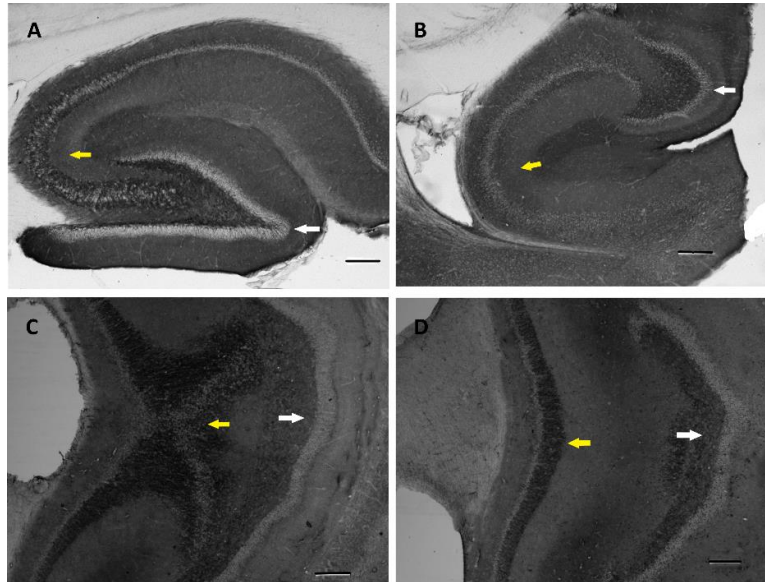


Figura 17. Inmunorreactividad de la SV2A en el eje temporo-medial. A) Hipocampo dorsal en la parte más medial; el giro dentado tiene una forma de “V” y el hipocampo es una “C” que ingresa a la zona más proximal del giro dentado. Se observa de manera clara la diferencia de densidades ópticas presentes en las capas del hipocampo. B) En el hipocampo ventral el giro dentado tiene una forma de “C” retraída, mientras que el hipocampo presenta la misma morfología. La densidad óptica en el hipocampo ventral se difumina ligeramente. C) Tanto el hipocampo dorsal como el ventral comienzan a alargarse en regiones más temporales; el giro dentado presenta forma de media luna y la región CA3 forma una “X”. D) En la zona más temporal, el giro dentado y el hipocampo tienen forma de media luna. En todos los paneles, la flecha amarilla señala al hipocampo y la flecha blanca al giro dentado. La barra de escala corresponde a 250 μm .

Inmunorreactividad de SV2A en los grupos experimentales

Se observaron cambios en la inmunorreactividad de SV2A a lo largo de la línea temporal de la generación de la epilepsia, siendo más evidente durante el SE. Estas modificaciones fueron región-específicas, en donde las capas con sinapsis axo somáticas tuvieron una mayor asociación con el SE y las capas con sinapsis axo dendríticas con la epilepsia. En la figura 18 se muestra un resumen de los cambios más importantes observados en las distintas etapas de evaluación; en las secciones adyacentes se describirá de manera más amplia.

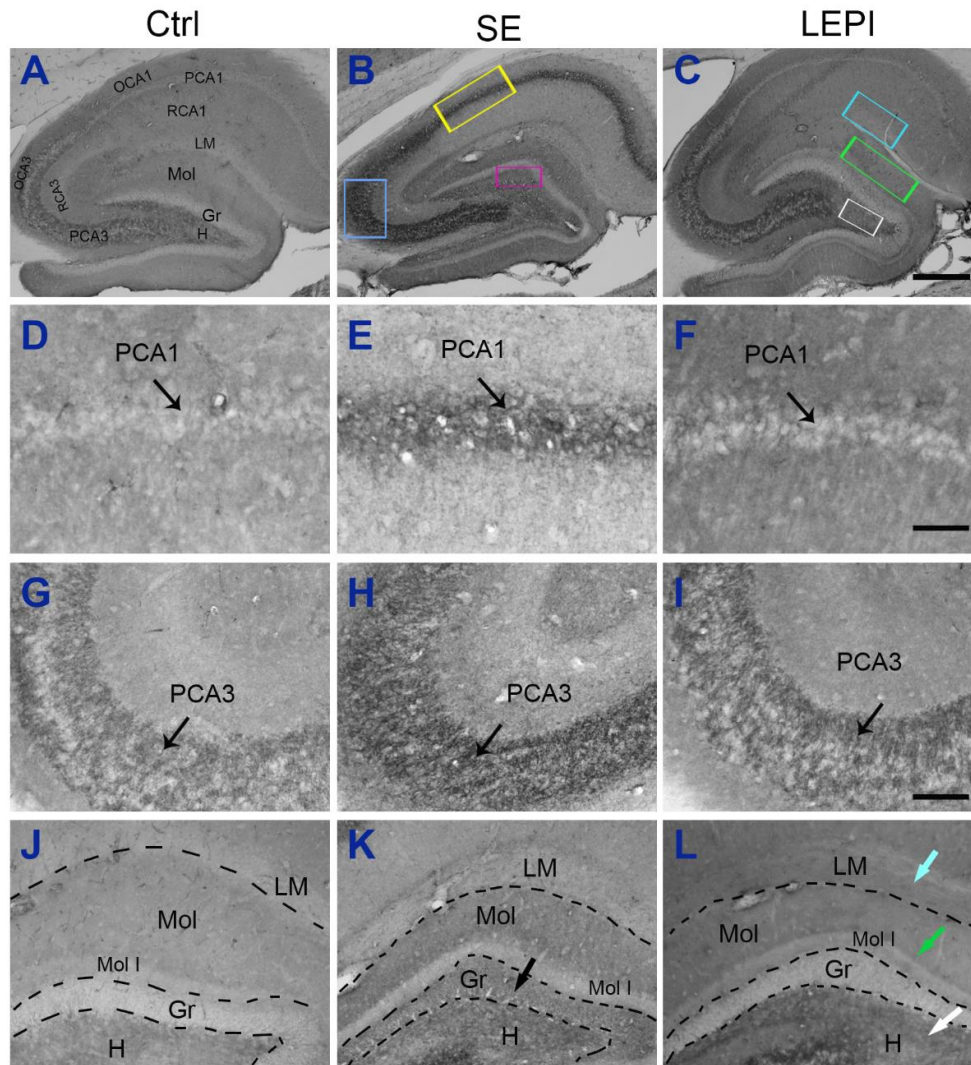


Figura 18. Principales variaciones de la inmunorreactividad de SV2A en la línea temporal de la generación de la epilepsia. Las fotomicrografías ilustran la inmunorreactividad de SV2A en secciones sagitales del hipocampo dorsal anterior de los grupos control (A, D, G y J), *status epilepticus* (B, E, H y K) y epiléptico tardío (C, F, I y L). B) En el grupo SE, la inmunorreactividad de SV2A aumentó de manera significativa en PCA1 (cuadrado amarillo y E, flecha), PCA3 (cuadrado azul y H, flecha) y granular (cuadrado magenta y K, flecha). C) En el grupo epiléptico tardío se observa un aumento en la inmunorreactividad de SV2A en el stratum lacunosum moleculare (cuadrado cian y L, flecha turquesa), capa molecular (cuadrado verde y L, flecha verde) e hilus (cuadrado blanco y L, flecha blanca). Abreviaturas SV2A: proteína de vesículas sinápticas 2A, Ctrl: control, SE: *status epilepticus*, LEPI: grupo epiléptico tardío, PCA3: capa piramidal de CA3, OCA3: *stratum oriens* de CA3, RCA3: *stratum radiatum* de CA3, PCA1: capa piramidal de CA1, OCA1: *stratum oriens* de CA1, RCA1: *stratum radiatum* de CA1, H: hilus, Mol: capa molecular, Mol I: capa molecular interna, Gr: capa granular, LM: *stratum lacunosum moleculare*. Barras de escala: A-C 500 μm; D-L 50 μm.

Variaciones en los niveles de SV2A del grupo SE

En los animales control, en las capas en donde se localizan los somas de las neuronas excitadoras (PCA3, PCA1 y granular) se observa una inmunorreactividad perisomática tenue de la SV2A, habiendo una tendencia hacia una coloración blanquecina en estas

zonas mientras que el resto de las capas se percibe en tonalidades grisáceas (Figura 18 A, D, G, J). En contraste, después del SE, en PCA1 (Figura 18 B, cuadro amarillo y E, flecha) se observa una franja oscura que enmascara la inmunorreactividad perisomática, además, el grosor de la capa aumenta ligeramente cuando se compara contra el control. En la micrografía de PCA3 de animales control se distingue en la zona infra y supra piramidal una inmunorreactividad intensa intercalada con una región en donde se observan los somas neuronales (Figura 18 G, flecha), mientras que durante el SE estos contrastes desaparecen, observándose de manera homogénea la intensa inmunorreactividad de la proteína en esta capa (Figura 18 B, cuadro azul y H, flecha). Con respecto a la capa granular, la micrografía de los animales control muestra que esta región presenta la menor inmunorreactividad en comparación con las capas pertenecientes al giro dentado (Figura 18 J), sin embargo, después del SE se observa un gran incremento en la intensidad de la tinción en esta capa, mostrando una inmunorreactividad similar a la capa hilar y molecular externa y siendo mayor que la molecular interna (Figura 18 B, cuadro magenta y K, flecha). No se encontraron diferencias significativas en las capas OCA1, RCA1, OCA3, RCA3, *lacunosum moleculare*, molecular e hilus. La cuantificación de la densidad óptica de la SV2A en PCA1 indica un aumento de 59 % para el hipocampo dorsal anterior y de 56 % para el dorsal posterior (Figura 19 A), en PCA3 el aumento corresponde a 37, 21 y 26 % para dorsal anterior, posterior y ventral de manera respectiva (Figura 19 B) y finalmente, la capa granular es la región que mostró la mayor densidad óptica teniendo un aumento, con respecto al control, de 113 % en el hipocampo dorsal anterior, de 86 % en el dorsal posterior y de 30 % en la región ventral (Figura 19 C).

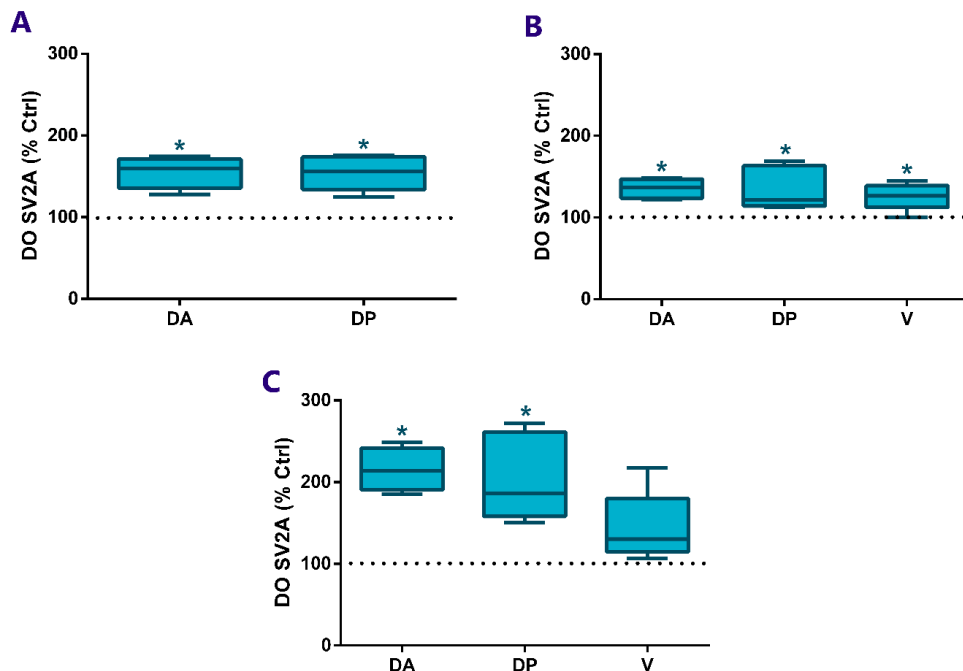


Figura 19. Diagrama de caja y bigotes que representa el aumento de la densidad óptica de la proteína SV2A en el grupo SE. Aumento de la densidad óptica de SV2A en PCA1 (A), PCA3 (B) y granular (C). Los valores se expresan como porcentaje de cambio en comparación con el grupo control (línea punteada). Los datos representan el valor mínimo, la mediana y el valor máximo de la densidad óptica normalizada de la proteína. Abreviaturas SE: *status epilepticus*, PCA1: capa piramidal de CA1, PCA3: capa piramidal de CA3, DO: densidad óptica, Ctrl: control, DA: dorsal anterior, DP: dorsal posterior, V: ventral. $p < 0.050$; *comparación con el grupo control $n = 5$.

Variaciones en los niveles de SV2A del grupo epiléptico temprano

Durante la epilepsia temprana, el incremento de la inmunorreactividad observada después del SE, disminuye a valores cercanos al control o incluso se encuentran por debajo de este grupo, sin embargo esta reducción sólo es significativa en PCA3 y OCA1. En el OCA1 y PCA3 se genera una disminución de 16 % en el hipocampo dorsal anterior y de 25 % en el dorsal posterior para la primera capa (Figura 20 A) y en la segunda capa el descenso es de 18, 11 y 5 % para dorsal anterior, posterior y ventral de manera respectiva (Figura 20 B).

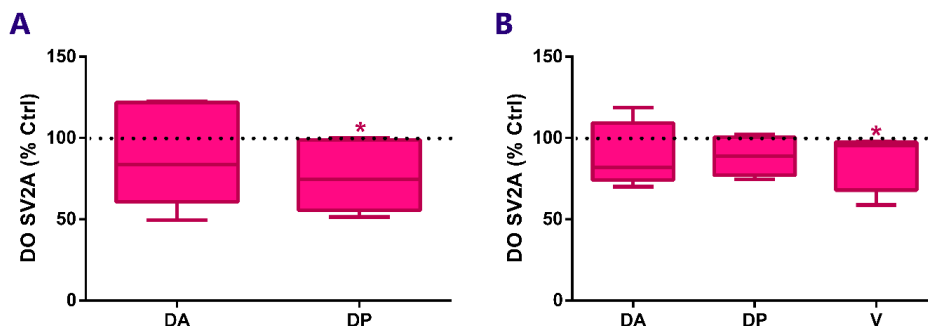


Figura 20. Diagrama de caja y bigotes que representa la disminución de la densidad óptica de la proteína SV2A en el grupo EEPI. Disminución de la densidad óptica de SV2A en OCA1 (A) y PCA3 (B). Los valores se expresan como porcentaje de cambio en comparación con el grupo control (línea punteada). Los datos representan el valor mínimo, la mediana y el valor máximo de la densidad óptica normalizada de la proteína. Abreviaturas EEPI: grupo epiléptico temprano, OCA1: *stratum oriens* de CA1, PCA3: capa piramidal de CA3, DO: densidad óptica, Ctrl: control, DA: dorsal anterior, DP: dorsal posterior, V: ventral. $p < 0.050$; *comparación con el grupo control $n = 5$.

Variaciones en los niveles de SV2A del grupo epiléptico tardío

A diferencia del grupo epiléptico temprano, en la etapa de la epilepsia tardía, las ratas generalmente mostraron un aumento en la inmunorreactividad de la proteína SV2A; a pesar de que este aumento se observó en todas las capas, sólo el *stratum lacunosum moleculare* (Figura 18 C, cuadro turquesa y L, flecha turquesa), la capa molecular (Figura 18 C, cuadro verde y L, flecha verde) y el hilus (Figura 18 C, cuadro blanco y L, flecha blanca) fueron significativamente diferentes cuando se compararon contra el grupo control (Figura 18 A y J). No se observaron diferencias significativas en OCA3, RCA3, PCA3, OCA1, RCA1, PCA1 y granular. Otro punto importante es que en contraste con el grupo del SE en donde los principales cambios sucedieron en capas somáticas, durante la epilepsia tardía el

aumento de la inmunorreactividad se dio en capas ocupadas principalmente por dendritas, tanto de células excitadoras como inhibitoras. Al realizar la cuantificación, en la capa molecular se observó un aumento de 42, 26 y 56 % en la región dorsal anterior, dorsal posterior y ventral respectivamente (Figura 21 A); la capa del hilus mostró un aumento de la densidad óptica en las tres regiones (en el dorsal anterior de 18 % y en el posterior de 12 %), pero solo fue diferente del control en la porción ventral con un incremento del 44 % (Figura 21 B); el valor de densidad óptica en la región posterior del *stratum lacunosum moleculare* fue 37 % mayor que el control, mientras que el incremento en la región anterior fue de 63 % siendo significativamente diferente con respecto al grupo control (Figura 21 C).

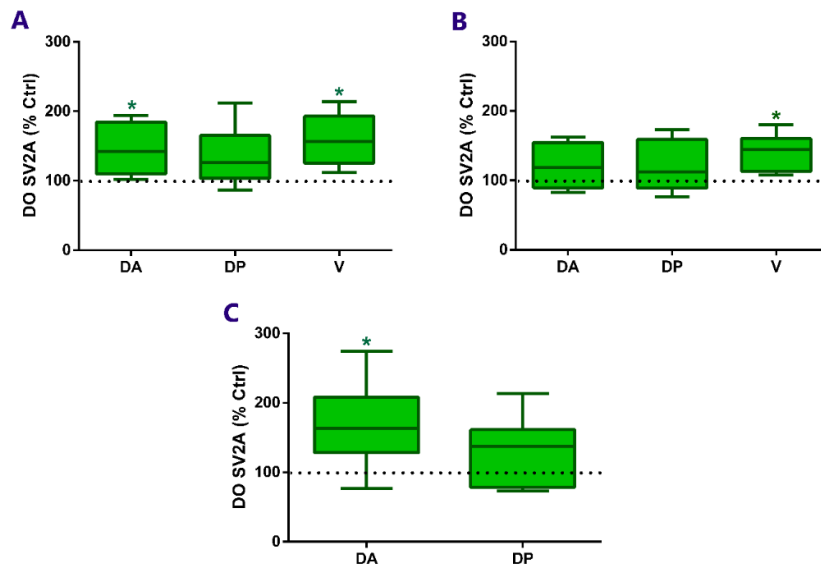


Figura 21. Diagrama de caja y bigotes que representa el aumento de la densidad óptica de la proteína SV2A en el grupo LEPI. Aumento de la densidad óptica de SV2A en la capa molecular (A), hilus (B) y *stratum lacunosum moleculare* (C). Los valores se expresan como porcentaje de cambio en comparación con el grupo control (línea punteada). Los datos representan el valor mínimo, la mediana y el valor máximo de la densidad óptica normalizada de la proteína. Abreviaturas LEPI: grupo epiléptico tardío, DO: densidad óptica, Ctrl: control, DA: dorsal anterior, DP: dorsal posterior, V: ventral. $p < 0.050$; *comparación con el grupo control $n = 6$.

Cambios de la proteína SV2A en el curso temporal de la generación de la epilepsia

De manera general, se observa una tendencia en las modificaciones de la proteína SV2A en los tres puntos de corte de la generación de la epilepsia. Durante la fase aguda hay un aumento de la inmunorreactividad de la proteína, mientras que durante la epilepsia temprana la inmunorreactividad regresa a valores semejantes al grupo control y finalmente durante la epilepsia tardía la inmunorreactividad vuelve a incrementar sin alcanzar los valores observados durante el SE (Figura 22). Este fenómeno es muy evidente en PCA1

(Figura 22 A), PCA3 (Figura 22 B) y capa granular (Figura 22 C) mientras que en las capas restantes los cambios son moderados.

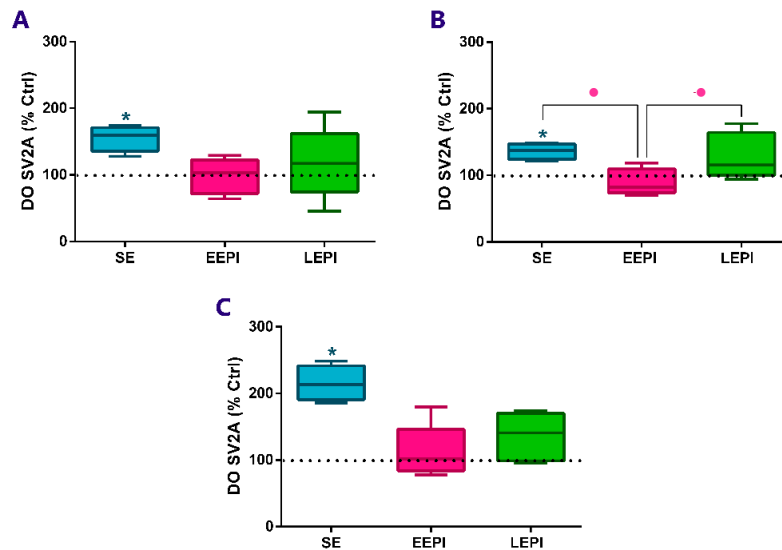


Figura 22. Diagrama de caja y bigotes que representa las modificaciones de la densidad óptica de SV2A en el curso temporal de la epilepsia. Durante el SE hay un aumento del 50-100 % en la densidad óptica de SV2A (caja azul); los valores de densidad óptica disminuyen hasta valores basales en el grupo epiléptico temprano (caja rosa) y finalmente en la epilepsia tardía la densidad óptica aumenta del 20-50 % (caja verde). El porcentaje de cambio en esta etapa nunca alcanza los valores reportados para el grupo SE. El panel (A) representa las modificaciones en los 3 grupos evaluados en PCA1, PCA3 (B) y capa granular (C). Los 3 paneles corresponden al hipocampo dorsal anterior. Los valores se expresan como porcentaje de cambio en comparación con el grupo control (línea punteada). Los datos representan el valor mínimo, la mediana y el valor máximo de la densidad óptica normalizada de la proteína. Abreviaturas DO: densidad óptica, Ctrl: control, SE: *status epilepticus*, EEPI: grupo epiléptico temprano, LEPI: grupo epiléptico tardío. $p < 0.050$; *comparación con el grupo control, ●comparación con el grupo EEPI.

Inmunorreactividad del transportador vesicular 1 para glutamato y para GABA

Inmunorreactividad de VGAT y VGLUT1 en animales control

Los transportadores vesiculares para GABA, glutamato y la proteína SV2A son proteínas localizadas en las vesículas sinápticas de manera transmembranal y entre ellas presentan un patrón de expresión similar, mostrando una inmunorreactividad puntiforme perisomal en las capas somáticas y difusa en las capas dendríticas. La mayor inmunorreactividad de VGAT se encontró en PCA1, PCA3 y capa granular, seguida por la capa molecular y el *stratum lacunosum moleculare*, a continuación por OCA3, OCA1, RCA3, RCA1; cabe resaltar que en la región hilar la inmunorreactividad es casi nula así como en el *stratum lucidum*, que a diferencia de la proteína SV2A existe una clara separación entre PCA3 y el *stratum lucidum* (Figura 23 A). Mientras que la mayor inmunorreactividad de VGAT se concentra en capas somáticas, la de VGLUT1 incluyó solo las capas dendríticas (OCA1, RCA1, OCA3, RCA3, molecular e hilus) con excepción del *stratum lacunosum moleculare*,

capa en la que la inmunorreactividad es prácticamente nula y PCA3 en donde la inmunorreactividad es intensa (Figura 23 B). A diferencia de VGAT, *el stratum lucidum* presenta una intensa inmunorreactividad debido a las terminales excitadoras provenientes de las células granulares; en la región infrapiramidal de CA3 se observa una intensa inmunorreactividad de VGLUT1 proveniente de la vía colateral de CA3, estos axones se intercalan en la capa PCA3. En la capa molecular se distinguen 3 diferentes intensidades de inmunorreactividad con respecto a VGLUT1; la capa molecular interna es la que presenta mayor inmunorreactividad.

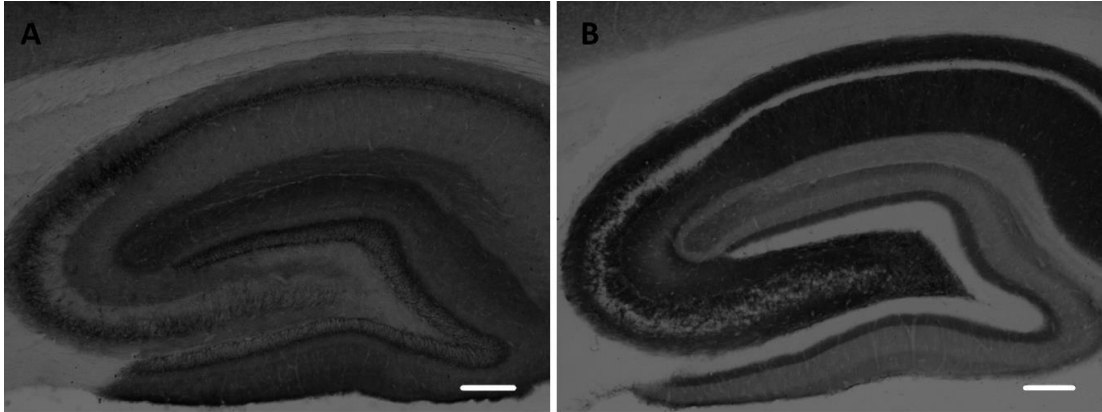


Figura 23. Fotomicrografía que muestra la inmunorreactividad de VGAT y VGLUT1 en el hipocampo de un animal control. A) Inmunorreactividad de VGAT; se observó una mayor intensidad en las capas somáticas, la capa molecular y el *stratum lacunosum moleculare*; en el hilus la marca prácticamente estuvo ausente. B) Inmunorreactividad de VGLUT1; esta proteína se distribuyó en las capas dendríticas con excepción del *stratum lacunosum moleculare*. En la capa granular y PCA1 la marca estuvo ausente, mientras que en PCA3 se observó una gran intensidad de inmunorreactividad. La mayor intensidad en la capa molecular corresponde a la capa molecular interna y la de menor intensidad a la capa molecular media. Las dos proteínas son complementarias. Abreviaturas VGAT: transportador vesicular para GABA, VGLUT1: transportador vesicular 1 para glutamato, PCA1: capa piramidal de CA1, PCA3: capa piramidal de CA3. La barra de escala corresponde a 250 μ m.

Variaciones en la inmunorreactividad de VGAT y VGLUT1 del grupo SE

Cuando se compara el grupo control (Figura 24 A, C y E) contra el grupo SE, se observa un aumento en la inmunorreactividad de VGAT de manera perisomal en PCA1, PCA3 y capa granular (Figura 24 B, D y F de manera respectiva, flecha); un hallazgo que se asocia con la elevada inmunorreactividad de SV2A en las mismas capas.

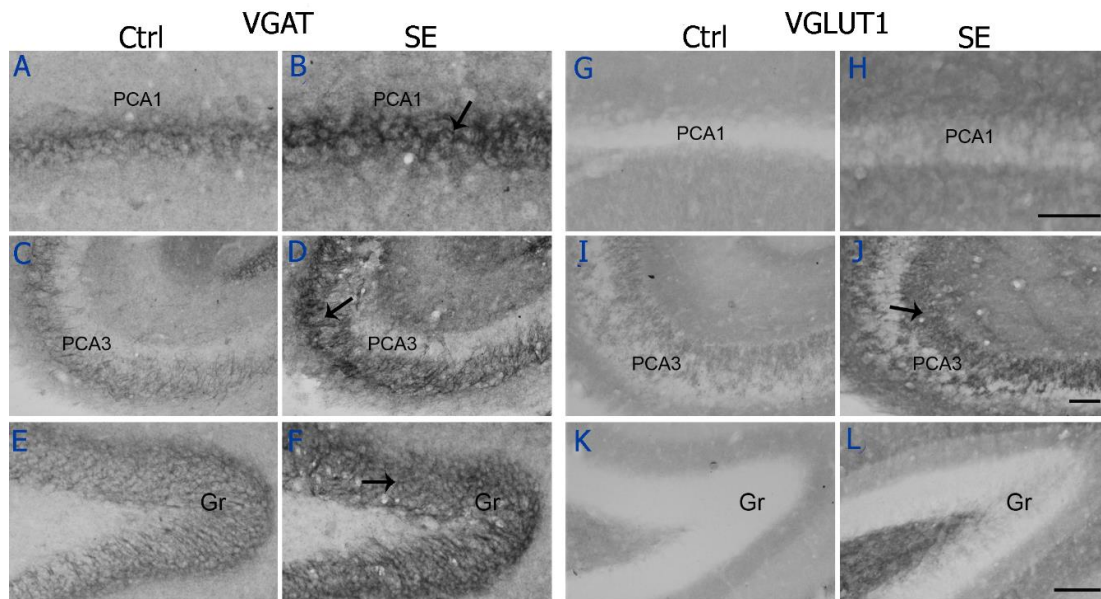


Figura 24. Incremento de la inmunorreactividad de VGAT y VGLUT1 en el SE. Las fotomicrografías ilustran la inmunorreactividad de VGAT (A-F) y VGLUT1 (G-L) en secciones sagitales del hipocampo dorsal anterior en el grupo control y SE. Durante el SE se observó un importante incremento en la inmunorreactividad de VGAT en PCA1 (B), PCA3 (D) y granular (F), mientras que la inmunorreactividad de VGLUT1 solo incrementó en PCA3 (J). Abreviaturas: VGAT: transportador vesicular para GABA, VGLUT: transportador vesicular 1 para glutamato, SE: *status epilepticus*. PCA1: capa piramidal de CA1, PCA3: capa piramidal de CA3, Gr: capa granular. Barra de escala: 100 μ m.

En esta etapa, en PCA1 (Figura 25 A-F), PCA3 (Figura 26 A-F) y granular (Figura 25 G-L) hay un aumento en la inmunofluorescencia de las proteínas VGAT (Figura 25 D y J, Figura 26 D) y SV2A (Figura 25 E y K, Figura 26 E) en comparación con el grupo control. En el panel F y L de la figura 25 y en el panel F de la figura 26, se muestra una elevada colocalización entre ambas proteínas, lo cual se observó como un intenso marcaje punteado de color amarillo.

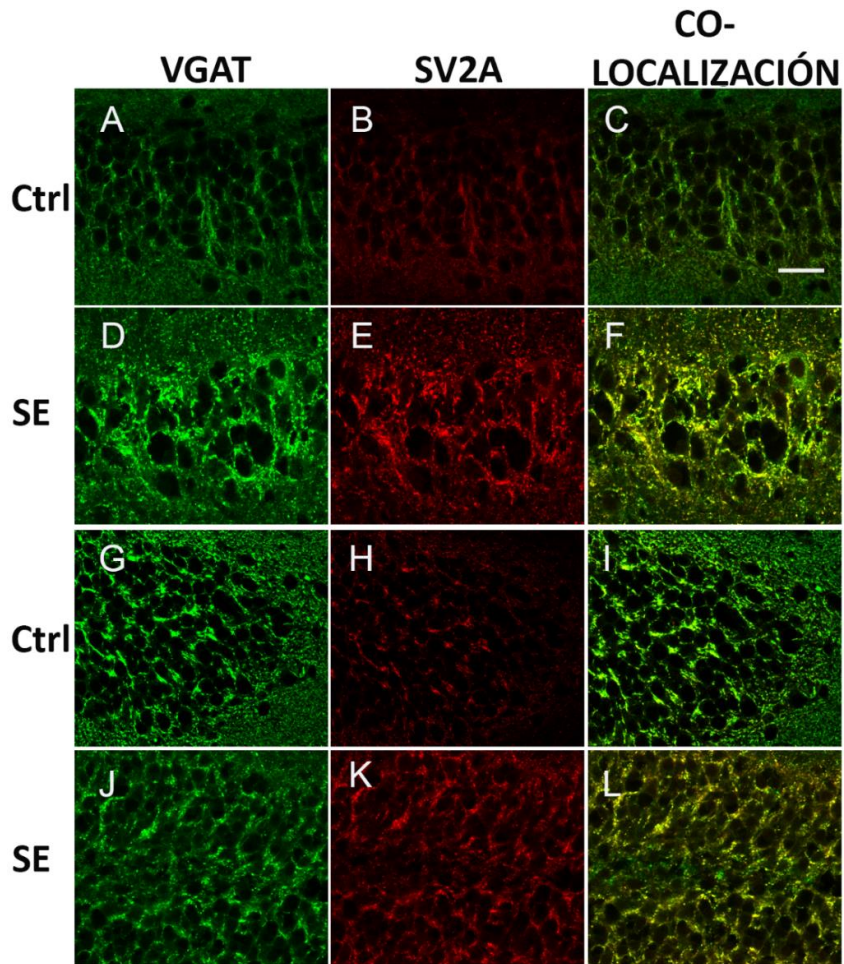


Figura 25. Colocalización de SV2A y VGAT en la capa granular y PCA1 en el grupo SE. Imágenes de microscopía confocal de secciones de hipocampo dorsal en donde se evalúa la inmunofluorescencia de VGAT y SV2A y su colocalización en PCA1 (A-F) y la capa granular (G-L), denotado con una coloración amarillenta. En el grupo SE hay un aumento en la inmunofluorescencia de VGAT y SV2A el cual correlaciona con una importante co-localización entre ambas proteínas en PCA1 (F) y granular (L) en comparación con control (C, I). Abreviaturas Ctrl: control, SE: *status epilepticus*, PCA1: capa piramidal de CA1, VGAT: transportador vesicular para GABA, SV2A: proteína de vesículas sinápticas 2A. Barra de escala A-L 30 μ m.

Con respecto a la inmunorreactividad y a la inmunofluorescencia de VGLUT1, durante el SE, sólo incrementó de manera considerable en PCA3 (Figura 26 J), en la región infrapiramidal de esta capa y en el *stratum lucidum*. En esta capa, el aumento en la inmunofluorescencia de SV2A, está asociada a ambos sistemas, el inhibitor y el excitador, observándose esta co-localización en la figura 26 F y L de manera respectiva. Cabe señalar que en PCA3, la co-localización entre VGAT y SV2A se presentó de manera primordial en la capa ocupada por los somas de las neuronas piramidales, mientras que la co-localización entre VGLUT1 y SV2A se originó en la región del *stratum oriens* y con mayor intensidad en el *stratum lucidum* (Figura 26 F y L).

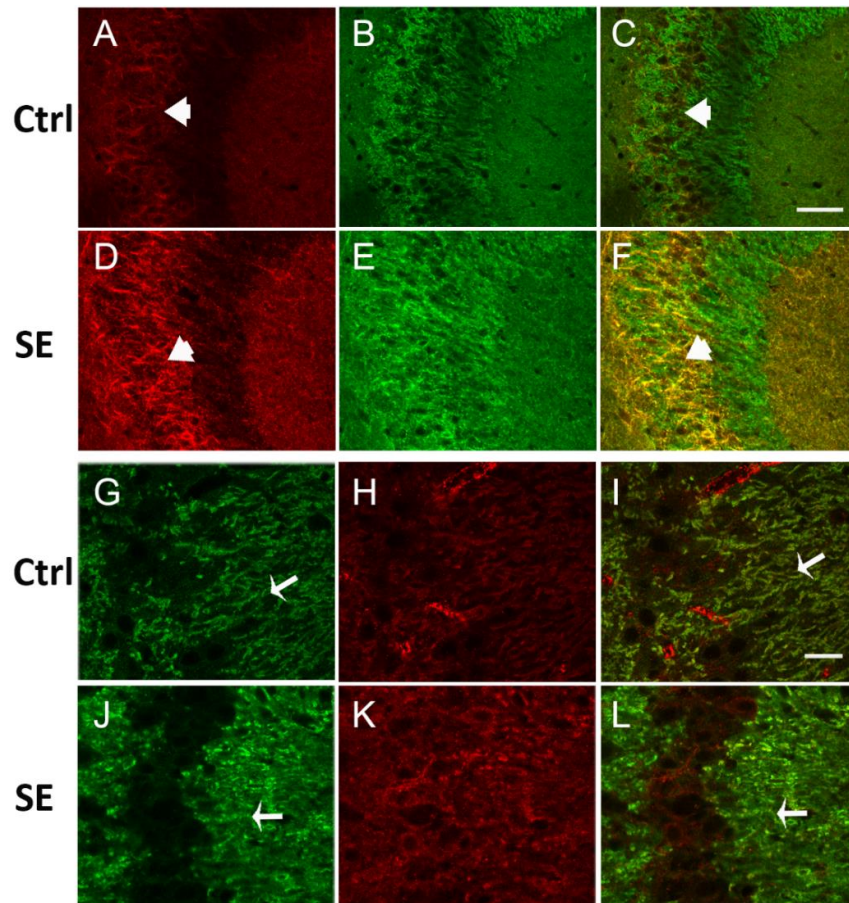


Figura 26. Colocalización de SV2A/VGAT y SV2A/VGLUT1 en PCA3 en el grupo SE. Imágenes de microscopía confocal de secciones de hipocampo dorsal en donde se evalúa la inmunofluorescencia de SV2A (B, E, H, K), VGAT (A, D), VGLUT1 (G, J) y su colocalización (C, F, I, L). En el grupo SE hay un aumento en la inmunofluorescencia de VGAT (D), VGLUT1 (J) y SV2A (E y K) en el cual se observa una importante co-localización entre VGAT/SV2A (F) y VGLUT1/SV2A (L) en comparación con el control (C, I). Nótese que la inmunofluorescencia de VGAT se localiza en PCA3 (cabeza de flecha) mientras que la marca de VGLUT1 se restringe al *stratum lucidum* y al *stratum oriens* (flechas). La inmunofluorescencia de SV2A involucra todos los estratos. Abreviaturas Ctrl: control, SE: *status epilepticus*, PCA3: capa piramidal de CA3, VGAT: transportador vesicular para GABA, VGLUT1: transportador vesicular 1 para glutamato, SV2A: proteína de vesículas sinápticas 2A. Barra de escala A-F 75 μ m; G-L 30 μ m.

En la cuantificación de la densidad óptica de VGAT se observa un aumento del 74 % de la densidad óptica en PCA1 (Figura 27 A), 71 % en PCA3 (Figura 27 B) y 50 % en la capa granular (Figura 27 C). El aumento en la densidad óptica de VGLUT1 fue de 300 % en PCA3 (Figura 27 B).

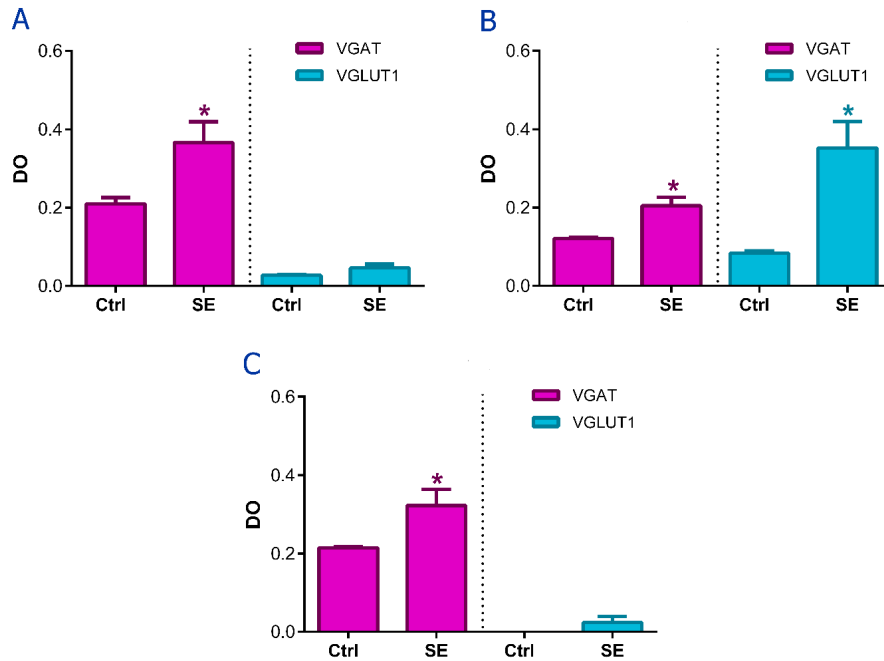


Figura 27. **Gráfica de barras que representa la densidad óptica de VGAT y VGLUT1 en el SE.** Las gráficas de barras muestran la densidad óptica de las secciones hipocámpales de los grupos control y SE en PCA1 (A), PCA3 (B) y granular (C). Los datos representan la media + SEM de 5 animales por grupo. Abreviaturas Ctrl: control, SE: *status epilepticus*, DO: densidad óptica, VGAT: transportador vesicular para GABA, VGLUT1: transportador vesicular 1 para glutamato, SEM: error estándar de la media. * $p < 0.050$, Prueba T de Student.

Variaciones en la inmunorreactividad de VGAT y VGLUT1 durante la epilepsia tardía

A diferencia del grupo SE, en donde el aumento de la proteína SV2A tuvo una mayor asociación con el sistema GABAérgico, durante la epilepsia tardía de manera sorprendente, los datos no mostraron ser diferentes del grupo control en todas las capas evaluadas, para ambos marcadores (Figura 28 y 29). Sin embargo, se observó una disminución evidente de VGLUT1 en la capa molecular interna durante el SE (Figura 28 D).

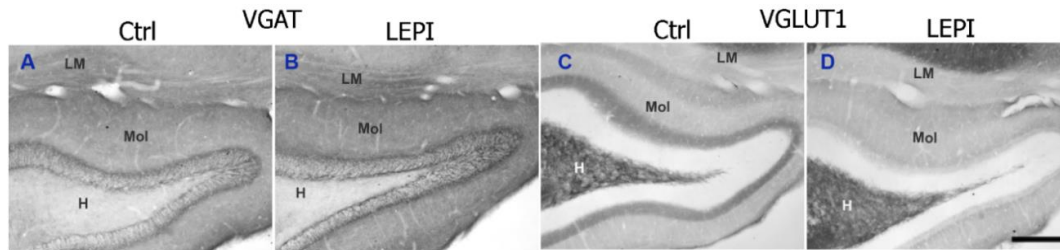


Figura 28. **Fotomicrografías que ilustran la inmunorreactividad de VGAT y VGLUT1 en el grupo epiléptico tardío.** En el *stratum lacunosum moleculare*, capa molecular e hilus de secciones sagitales del hipocampo dorsal anterior no se encontraron diferencias entre el grupo control (A y C) y el grupo epiléptico tardío (B y D) en ningún marcador. Abreviaturas Ctrl: control, LEPI: grupo epiléptico tardío, VGAT: transportador vesicular para GABA, VGLUT1: transportador vesicular 1 para glutamato, LM: *stratum lacunosum moleculare*, Mol: capa molecular, H: hilus. Barra de escala 100 μm .

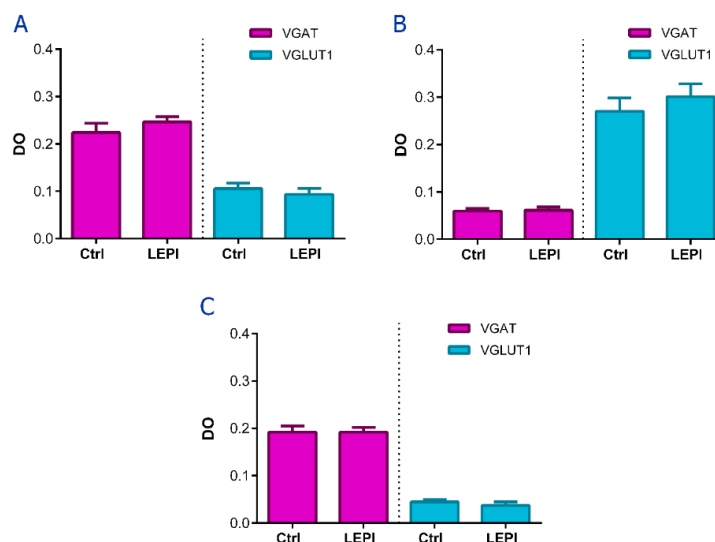


Figura 29. Gráfica de barras que representa la densidad óptica de VGAT y VGLUT1 en el grupo epiléptico tardío. Las gráficas representan los valores de la densidad óptica relativa obtenida de secciones hipocámpales de los grupos control y LEPI. Los datos representan la media + SEM. Ctrl n = 4; LEPI n = 5. Abreviaturas Ctrl: control, LEPI: grupo epiléptico tardío, DO: densidad óptica, VGAT: transportador vesicular para GABA, VGLUT1: transportador vesicular 1 para glutamato, SEM: error estándar de la media.

RESULTADOS PARA EL OBJETIVO PARTICULAR 2

Correlacionar los niveles de SV2A de ratas epilépticas con el efecto del levetiracetam sobre las crisis espontáneas recurrentes.

Análisis de las crisis espontáneas recurrentes y niveles en sangre del fármaco en ratas tratadas con levetiracetam

Los datos del grupo epiléptico tardío tratados con levetiracetam mostraron un promedio de 5.3 ± 0.7 crisis conductuales totales, con un mínimo de 3 crisis y un máximo de 7 crisis por animal antes del tratamiento (estos valores son consistentes con nuestras observaciones previas en ratas epilépticas) y 2.5 ± 0.8 crisis totales, con un mínimo de 0 crisis y un máximo de 5 crisis por animal durante el tratamiento (Tabla 2). De manera notable, aunque los animales tratados con levetiracetam mostraron comportamientos de levantamientos y caídas (fase 5 en la escala de Racine) al presentar una crisis, su conducta fue menos intensa o violenta durante el tratamiento con levetiracetam. De las 6 ratas epilépticas tratadas con levetiracetam, 3 presentaron una reducción $> 50\%$ en el número de crisis durante la semana del tratamiento, por lo tanto, se definieron como responsivas al tratamiento (EPI R). En este grupo, al comparar el número de crisis antes y durante el tratamiento se observa una diferencia significativa en la frecuencia (crisis por semana). Por

el contrario, 3 ratas exhibieron una reducción menor al 50 % en el número de crisis y con ello representaron el grupo epiléptico no responsivo al levetiracetam (EPI NR, Tabla 2). En el día 4 de tratamiento, la concentración de levetiracetam en muestras de sangre de los grupos control, epiléptico responsivo y no responsivo al levetiracetam fueron 33.4 ± 1.9 , 27.3 ± 6.7 y 24.6 ± 1.8 $\mu\text{g/mL}$ de manera respectiva; en el día 7 los valores correspondieron a 59.7 ± 6.5 , 36.4 ± 4.1 y 40.5 ± 2.8 $\mu\text{g/mL}$. Cabe señalar que ambos grupos experimentales fueron estadísticamente diferentes al control, probablemente debido a que el levetiracetam permanece más tiempo en las terminales altamente activas propias de los grupos epilépticos (Tabla 2). Estos datos son consistentes con informes anteriores y corresponden a niveles terapéuticos apropiados (Gliem *et al.*, 2002; Margineanu *et al.*, 2008).

Tabla 2. Niveles en sangre del fármaco y la frecuencia de crisis espontáneas en ratas tratadas con levetiracetam

Grupo	Frecuencia de crisis/semana		Levetiracetam $\mu\text{g/mL}$	
	Antes Tx	Durante Tx	Día 4	Día 7
Ctrl L	0	0	32.21	62.56
Ctrl L	0	0	28.9	65.74
Ctrl L	0	0	29.85	36.48
Ctrl L	0	0	37.36	58.31
Ctrl L	0	0	38.5	75.63
Media \pm SEM	0	0	33.4 ± 1.9	59.7 ± 6.5
EPI R	6	1	N.D.	32.59
EPI R	7	0	33.95	32
EPI R	5	2	20.65	44.7
Media \pm SEM	6 ± 0.6	1 ± 0.6•	27.3 ± 6.7	$36.4 \pm 4.1^*$
EPI NR	4	4	21.07	45.97
EPI NR	3	3	26.04	36.64
EPI NR	7	5	26.81	38.76
Media \pm SEM	4.7 ± 1.2	4 ± 0.6	24.6 ± 1.8	$40.5 \pm 2.8^*$

Ctrl L: grupo control tratado con levetiracetam, SEM: error estándar de la media, EPI R: grupo epiléptico responsivo al levetiracetam, EPI NR: grupo epiléptico no responsivo al levetiracetam, Tx: tratamiento, N.D.: no determinado. * $p < 0.050$, diferencias con respecto al control, Análisis de Varianza de una vía y las comparaciones múltiples por el método de Student-Newman-Keuls. • $p < 0.050$ Prueba T pareada.

Variaciones de la inmunorreactividad de SV2A en ratas tratadas con levetiracetam

Los cambios más evidentes en la inmunorreactividad de SV2A en los grupos tratados con levetiracetam, se detectaron en las capas dendríticas. El grupo no responsivo al fármaco

presentó una menor densidad óptica de SV2A en OCA1, RCA1, RCA3, hilus y capa granular en comparación con el grupo control y el grupo epiléptico responsive al levetiracetam (Figura 30). Los animales tratados con levetiracetam presentaron una mayor inmunorreactividad de SV2A en las capas granular y PCA1, siendo más notable el aumento en los grupos epilépticos.

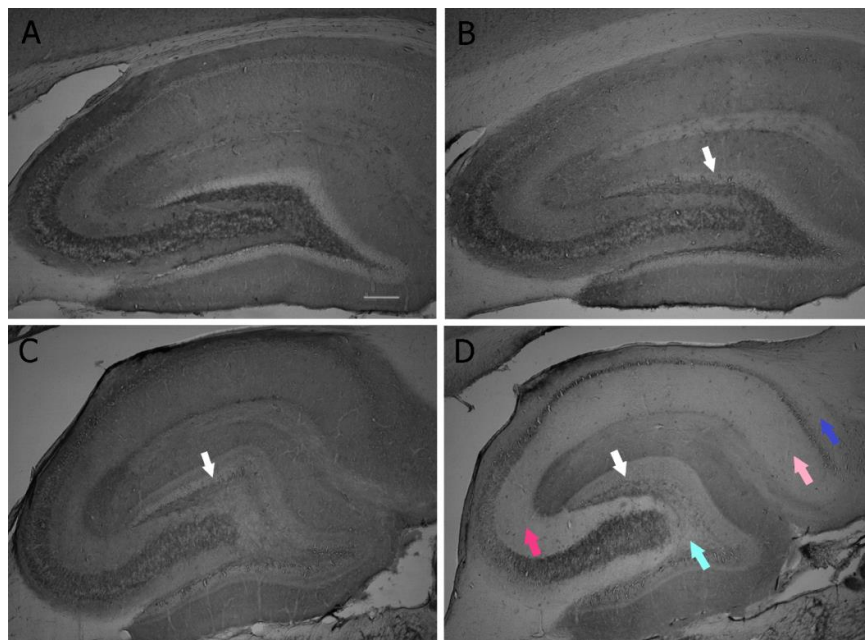


Figura 30. Micrografías que muestran la inmunorreactividad de SV2A de animales tratados con levetiracetam. Cortes sagitales de hipocampo dorsal en donde se observa que el grupo epiléptico no responsive al levetiracetam (D) tuvo una disminución en la inmunorreactividad de SV2A en el *stratum oriens* de CA1 (flecha azul), *stratum radiatum* de CA1 (flecha rosa) y CA3 (flecha magenta) e hilus (flecha turquesa). El grupo responsive al tratamiento (C) y el control tratado con levetiracetam (B) tuvieron una inmuoreactividad muy semejante al control (A) en todas las capas analizadas, con excepción de la capa granular (flecha blanca), en donde se observa un aumento de la inmunoreactividad de la proteína en los 3 grupos tratados con levetiracetam. La barra de escala corresponde a 250 μ m.

Al analizar la densidad óptica de la SV2A se observó que en el grupo control tratado con levetiracetam hubo una disminución del 34 % en RCA1, 25 % en OCA1, 28 % en RCA3 y 28 % en el hilus (Figura 31 A-D), sin embargo no mostró diferencias significativas con respecto al grupo control. El grupo responsive al fármaco tuvo valores semejantes al control en RCA1, RCA3 y OCA1 (Figura 31 A-C), la densidad óptica disminuyó 16 % en el hilus (Figura 31 D) y en la capa granular aumentó 24 % (Figura 31 E), no presentando diferencias significativas con respecto al control en ninguna de las capas analizadas. La densidad óptica del grupo epiléptico no responsive al tratamiento disminuyó 78 % en RCA1 (Figura 31 A), 56 % en RCA3 (Figura 31 B), 70 % en OCA1 (Figura 31 C), 54 % en el hilus (Figura 31 D) y la capa granular (Figura 31 E), siendo estadísticamente diferente con respecto al

control en el OCA1 e hilus y diferente del grupo responsive en RCA1, RCA3, OCA1 y granular.

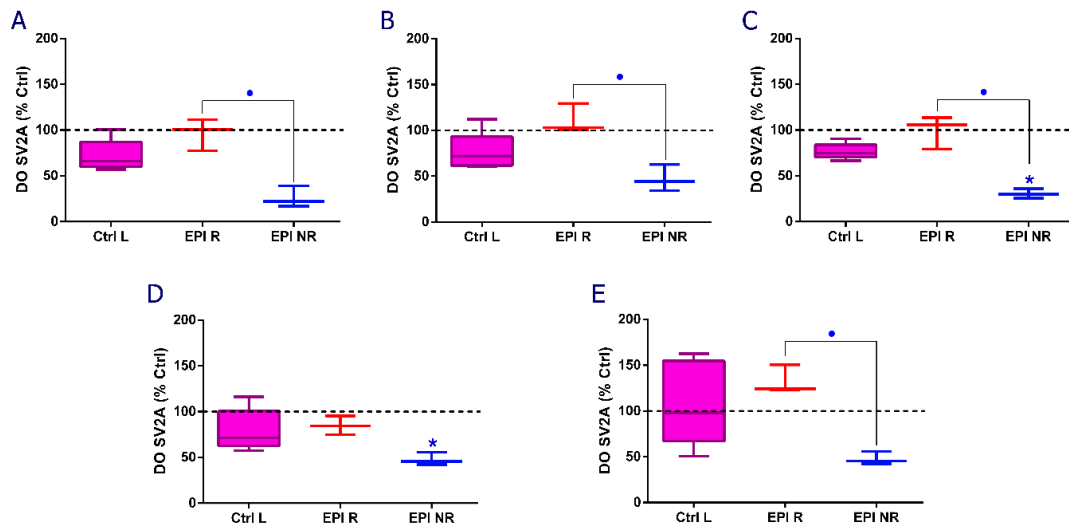


Figura 31. Diagrama de caja y bigotes que representa la densidad óptica de la proteína SV2A en los grupos tratados con levetiracetam. En el grupo no responsive al levetiracetam se observa una disminución de la densidad óptica de SV2A en el *stratum radiatum* de CA1 (A), *stratum radiatum* de CA3 (B), *stratum oriens* de CA1 (C), hilus (D) y granular (E). Los valores se expresan como porcentaje de cambio en comparación con el grupo control (línea punteada). Los datos representan el valor mínimo, la mediana y el valor máximo de la densidad óptica normalizada de la proteína. Abreviaturas DO: densidad óptica, Ctrl: control, Ctrl L: control tratado con levetiracetam, EPI R: grupo epiléptico responsive al levetiracetam, EPI NR: grupo epiléptico no responsive al levetiracetam. $p < 0.05$ * vs control y • $p < 0.05$ entre grupos. Ctrl L n = 5; EPI R n = 3; EPI NR n = 3.

En el *stratum lacunosum moleculare* también se observó una disminución de la densidad óptica de SV2A del 54 %, 11 % y 48 % para el grupo control tratado con levetiracetam, el grupo responsive y el no responsive, de manera respectiva, pero no hubo diferencias entre grupos (Figura 32 A); mientras que la capa molecular mostró un incremento del 44 % en el grupo no responsive (Figura 32 B).

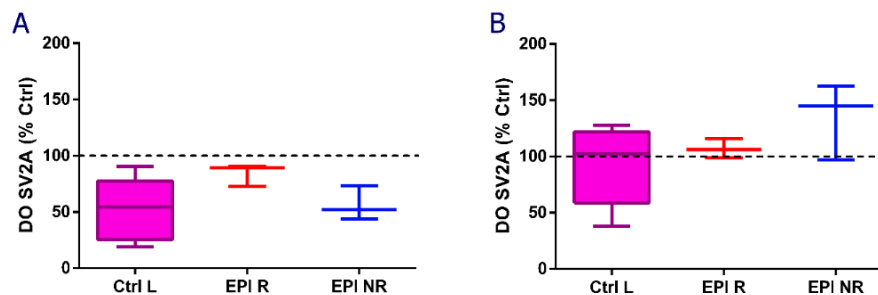


Figura 32. Diagrama de caja y bigotes que representa la densidad óptica de la proteína SV2A en la capa molecular y el *stratum lacunosum moleculare*. En el *stratum lacunosum moleculare* (A) hay una disminución de la densidad óptica en los 3 grupos. La única capa en la que el grupo no responsive presenta un aumento de la densidad óptica es la capa molecular (B). Los valores se expresan como porcentaje de cambio en comparación con el grupo control (línea punteada). Los datos representan el valor mínimo, la mediana y el valor máximo de la densidad óptica normalizada de la proteína. Abreviaturas DO: densidad óptica, Ctrl: control, Ctrl L: control tratado con

levetiracetam, EPI R: grupo epiléptico responsive al levetiracetam, EPI NR: grupo epiléptico no responsive al levetiracetam. Ctrl L n = 5; EPI R n = 3; EPI NR n = 3.

8. DISCUSIÓN

En los últimos años, la SV2A se ha convertido en una atractiva proteína de estudio debido a su asociación con la fisiopatología de la epilepsia y otras enfermedades neurológicas (Löscher *et al.*, 2016). Se han reportado variaciones en la expresión de esta proteína en pacientes con epilepsia y modelos animales de epilepsia (Feng *et al.*, 2009; van Vliet *et al.*, 2009; Crèvecoeur *et al.*, 2014; Matveeva *et al.*, 2007, 2008). Por lo tanto, el aumento o disminución de la inmunorreactividad de SV2A podría correlacionarse con cambios sinápticos específicos en el tejido nervioso, contribuir a la etiología de la enfermedad y, debido a que es el blanco terapéutico del fármaco antiepiléptico levetiracetam, sutiles cambios en los niveles de la proteína podrían ser un factor decisivo en la respuesta al tratamiento con levetiracetam.

En el presente trabajo nosotros observamos cambios en la inmunorreactividad de SV2A específicos de región y de etapa epiléptica. Durante la etapa aguda (SE) aumentó la densidad óptica de la proteína en capas conformadas principalmente por somas neuronales, sin embargo, durante la etapa de epilepsia temprana la inmunorreactividad de SV2A regresó a niveles basales y finalmente durante la etapa crónica (epilepsia consolidada o tardía) los niveles de la proteína en capas dendríticas tuvieron una gran variabilidad arrojando de manera general un aumento en los niveles de ésta. Durante la etapa aguda, el aumento de la densidad óptica de SV2A estuvo asociado principalmente con el sistema GABAérgico, mientras que durante la fase crónica no encontramos una asociación específica con los marcadores evaluados. A pesar de que durante la epilepsia hubo un aumento en los niveles de SV2A de manera global, al realizar un análisis individual observamos una drástica disminución de la proteína en algunos animales, lo cual tuvo una asociación directa con la respuesta al tratamiento con levetiracetam, es decir, los animales con este decremento en la proteína no respondieron de manera favorable al fármaco.

Durante el SE, nosotros esperábamos ver una disminución en la inmunorreactividad de SV2A debido al proceso excitotóxico, el cual es responsable de la grave pérdida neuronal reportada durante esta etapa; sin embargo, nuestros datos fueron contrarios a lo esperado. Nosotros observamos un aumento en la densidad óptica de SV2A en las capas piramidales del hipocampo y en la capa granular del giro dentado. Estos estratos se encuentran conformados de manera primordial por somas neuronales, los cuales están altamente inervados por conexiones axo somáticas y axo axónicas provenientes de una gran variedad de interneuronas GABAérgicas, p. ej. interneuronas en forma de candelabro, en forma de canasta, trilineares radiales y horizontales (Amaral & Lavenex, 2007; Spruston & McBain,

2007), por lo que nosotros asumimos que el incremento en la densidad óptica de SV2A estaba asociado con estas células. Esta gran diversidad de interneuronas podrían estar siendo altamente activadas para contener la excesiva actividad neuronal excitadora, propia de SE, esto a través del incremento en el reciclado vesicular lo que llevaría al aumento de la inmunorreactividad de SV2A. Los datos obtenidos de las inmunofluorescencias respaldaron nuestra hipótesis. El aumento de la inmunorreactividad de VGAT indicó una alta demanda del neurotransmisor inhibitor, además la coexpresión entre SV2A y VGAT se vio aumentada durante el SE en las capas somáticas mencionadas con anterioridad. Estos resultados sugieren que la SV2A podría tener una relación preferencial con el sistema GABAérgico, diversos autores han reportado una mayor asociación entre SV2A y el sistema GABAérgico (Tokudome *et al.*, 2016a, 2016b; Venkatesan *et al.*, 2012). A través de la mutación de SV2A se observó en un modelo genético de epilepsia, había una disminución en la liberación del neurotransmisor GABA pero no de glutamato, cabe señalar que los niveles basales de los neurotransmisores no estuvieron afectados (Tokudome *et al.*, 2016a, 2016b). Además, al evaluar las corrientes postsinápticas inhibitoras y excitadoras en rebanadas de hipocampo (CA1) de animales SV2A KO, los autores reportan que hay una disminución en la frecuencia y amplitud de las corrientes postsinápticas inhibitoras espontáneas, mientras que sólo se observa un aumento en la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitadoras espontáneas (Venkatesan *et al.*, 2012); sin mostrar diferencia en las corrientes miniatura excitadoras e inhibitoras. Tanto los datos aportados por Tokudome *et al.* (2016a, 2016b), como los de Venkatesan *et al.* (2012), apoyan el hecho de que SV2A está más involucrada con el sistema inhibitor, además de regular la liberación de los neurotransmisores dependiente del potencial de acción, sin afectar la liberación basal (Custer *et al.*, 2006; Crowder *et al.*, 1999).

Otra posible explicación del aumento en la expresión de SV2A en el sistema GABAérgico sería a través de las vías glutamatérgicas altamente excitadas en CA3 y la capa granular del hipocampo. Se ha observado que después de 1 hora de SE, hay un incremento en el número de receptores funcionales para NMDA en las células granulares del giro dentado y en las dendritas proximales de las células piramidales del hipocampo, asociado con un incremento en la respuesta postsináptica de estas células; además el incremento de la subunidad NR1 del receptor NMDA se observa en la vecindad del marcador presináptico sinaptofisina (Naylor *et al.*, 2013; Wasterlain *et al.*, 2013). Este aumento de los receptores glutamatérgicos podría sobreactivar a las interneuronas GABAérgicas o bien, también podría aumentar el número de receptores NMDA en las células inhibitoras y con ello habría una mayor activación de estas células produciendo el aumento en el reciclado vesicular del que hablamos de manera previa. En este mismo contexto, el aumento de los receptores

glutamatérgicos que genera un flujo de calcio al interior celular podría influir en la expresión y síntesis de proteínas asociadas con la exocitosis (Jang *et al.*, 2004). De hecho, se ha reportado que después de 8 horas de inducir SE, hay una regulación a la alta del mRNA de la proteína vesicular sinaptotagmina 7 en estructuras involucradas en la generación de crisis (Gavlan *et al.*, 2012). Así mismo, también se reportó que después del SE hay un ligero incremento de la proteína Mint-1 en el giro dentado (Scorza *et al.*, 2003).

En la etapa temprana de la epilepsia, el aumento en los niveles de SV2A observado durante el SE regresa a valores control o incluso disminuye. Este hallazgo puede explicarse por la reducción de la actividad neuronal observada en esta etapa en comparación con la actividad continua del SE, y por la marcada pérdida neuronal reportada para este modelo de epilepsia (Scorza *et al.*, 2009; Curia *et al.*, 2008).

Por otro lado, aunque las alteraciones en la inmunorreactividad de SV2A observadas durante el SE fueron transitorias y homogéneas, las modificaciones en los niveles de SV2A durante la fase crónica de la epilepsia presentaron una alta variabilidad. Esta diferencia puede deberse a diversos elementos modificados durante la epileptogénesis, los cuales se consolidan en esta etapa. Uno de ellos es la reorganización sináptica de las fibras musgosas en el giro dentado; durante el SE hay una severa muerte neuronal de células piramidales e hilares (Curia *et al.*, 2008), esta pérdida provoca que los axones de las células granulares se retraigan hacia la capa molecular para establecer nuevos contactos sinápticos, este fenómeno se denomina sprouting de las fibras musgosas; esta reorganización podría ser la razón por la que observamos un aumento de la densidad óptica de SV2A en la capa molecular en el grupo epiléptico tardío.

De manera previa se ha reportado que durante la epilepsia hay un aumento en la excitabilidad neuronal de las células piramidales de la corteza entorrinal (Levesque *et al.*, 2015), las cuales establecen contactos sinápticos con las dendritas de las células granulares en la capa molecular, y con las dendritas basales de las neuronas piramidales de CA1 e interneuronas presentes en el *stratum lacunosum moleculare* (Amaral & Lavenex, 2007). Esta mayor excitabilidad podría aumentar el reciclado vesicular de las células piramidales de la corteza entorrinal y con ello el aumento en los niveles de SV2A. Además, durante la epilepsia se ha reportado un aumento en el tamaño de los botones sinápticos aunado a altas tasas de liberación vesicular habiendo un aumento en el número de vesículas fácilmente liberables y del pool de reciclado (Upreti *et al.*, 2012), esta alterada maquinaria presináptica apoya nuestra hipótesis del mayor reciclado vesicular y por lo tanto el aumento de la expresión de SV2A.

Trabajos previos han reportado un ligero incremento en el proceso de neurogénesis en el hilus de ratas sometidas a SE a través de la administración de pilocarpina y que de manera

posterior generaron crisis espontáneas (Cha *et al.*, 2004). En otro estudio se emplearon ratas sometidas a SE y marcadas con un retrovirus syp-YPF 4 días después y sometidas a eutanasia 8 semanas posteriores a la inducción del SE para evaluar la inmunorreactividad de YPF en neuronas granulares de reciente formación del giro dentado; se observó que estas células contribuyeron al *sprouting* de fibras musgosas en la capa molecular interna (Althaus *et al.*, 2016). El aumento de la densidad óptica de SV2A en el hilus podría deberse al nacimiento de neuronas en el giro dentado, con lo cual hay una sinaptogénesis a través de dos vías; estas nuevas células reciben contactos sinápticos y a su vez, ellas comienzan a inervar a otras células.

Por otro lado, el aumento en la inmunorreactividad de SV2A no es un caso aislado, ya que también se ha observado el aumento de otras proteínas de vesículas sinápticas durante la fase crónica de la epilepsia, tal es el caso de la sinaptofisina y sinapsina (Chen *et al.*, 1996; Károly *et al.*, 2011). En dos modelos diferentes de ELT, uno a través de la perfusión de ácido kaínico en la corteza sensorial motora y otro por aplicación sistémica de pilocarpina, se observó un aumento en la inmunorreactividad de sinaptofisina en la región afectada por el ácido kaínico y un aumento de sinapsina en el *stratum lucidum*, capa molecular interna e hilus de ratas tratadas con pilocarpina; este aumento podría estar asociado con una reorganización axonal o a sinaptogénesis (Chen *et al.*, 1996; Károly *et al.*, 2011).

Durante la etapa crónica nosotros no pudimos hacer una asociación entre SV2A y los sistemas GABAérgico o glutamatergico, probablemente debido a que sólo analizamos la inmunorreactividad de un transportador vesicular para glutamato y en el hipocampo se ha reportado la localización de 3 isoformas, sin embargo el que presenta una mayor expresión es VGLUT1. De manera previa se ha reportado que en pacientes con ELT y esclerosis hipocámpica hay una redistribución de los 3 tipos de transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3), manteniéndose la expresión de VGLUT1 sin cambios, mientras que hay una disminución y un aumento de VGLUT2 y VGLUT3, respectivamente (Van Liefferinge *et al.*, 2015).

El aumento en la inmunorreactividad de SV2A en el tejido hipocámpico de nuestros animales concuerda con los cambios reportados por Matveeva *et al.* (2007) y Ohno *et al.* (2009), quienes observaron un aumento en los niveles de SV2A en modelos de *kindling*, mientras que difieren de los estudios realizados por van Vliet *et al.* (2009) y Hanaya *et al.* (2012) quienes reportaron una disminución en la expresión de SV2A. Estas diferencias podrían deberse al tipo de modelo animal utilizado para inducir la epilepsia y a las técnicas de cuantificación empleadas. Otro punto importante es que estos autores evaluaron la inmunorreactividad de SV2A 6 meses después de la inducción del SE, por lo tanto, la disminución de la marca podría deberse a la presencia de una alta frecuencia de crisis

espontáneas recurrentes que generarían excitotoxicidad y muerte neuronal. Por lo tanto, nuestros resultados pueden ser útiles para comprender las variaciones de SV2A al comienzo de la enfermedad.

De hecho, se ha reportado que tanto la ausencia, como la sobre expresión de la proteína SV2A producen un registro electrofisiológico similar; al evaluar las corrientes post sinápticas excitadoras se observa que en ambas condiciones disminuyen en comparación con el grupo control (Custer *et al.*, 2006; Nowack *et al.*, 2011). Además, modificaciones en los niveles de la proteína SV2A se han asociado con la presencia de crisis (Janz *et al.*, 1999; Crowder *et al.*, 1999; Matveeva *et al.*, 2007, 2008).

Contrario a lo planteado en la hipótesis, nosotros observamos de manera global, un aumento en la inmunorreactividad de SV2A asociado a dos factores, el reciclado vesicular y una posible sinaptogénesis ocurrida en ambas etapas, SE y epilepsia tardía. Además, también se había propuesto que la posible disminución en la inmunorreactividad de la proteína sería un indicador de progresión de enfermedad, sin embargo, nuestros datos proponen que el aumento en la inmunorreactividad de SV2A podría ser un elemento de contención de la enfermedad y no de progresión, ya que animales que presentaron un elevado número de crisis no mostraron disminución en los niveles de proteína. A pesar de que en la epilepsia tardía el aumento de la inmunorreactividad ocurrió en capas en donde se llevan a cabo conexiones excitadoras no se puede descartar la presencia de sinaptogénesis inhibitoras, esto debido a dos puntos, el primero de ellos es que la SV2A tuvo una mayor asociación con el sistema GABAérgico durante el SE; el segundo punto es debido a que durante la epilepsia tardía no hubo un aumento de los transportadores evaluados, sin embargo, si hubiera un aumento de la inmunorreactividad de VGLUT3 como se ha reportado en pacientes, esto indicaría una mayor asociación con el sistema inhibitor. De lo contrario, si el aumento en la inmunorreactividad de SV2A está asociado con el sistema glutamatérgico, entonces la proteína permitiría el mantenimiento de la actividad excitadora y por tanto, la generación de crisis.

Por otro lado, como se mencionó de manera previa, cuando realizamos el análisis global de la inmunorreactividad de SV2A en la etapa crónica, observamos un aumento en el lacunosum molecular y en la capa molecular, pero de manera interesante tuvimos una alta variabilidad interindividual que estuvo asociada con la respuesta favorable al tratamiento con levetiracetam. Nuestros resultados muestran que SV2A fue esencial para la respuesta al tratamiento. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que muestra la relación entre los niveles de SV2A y la respuesta al tratamiento con levetiracetam en un modelo animal de epilepsia crónica. De manera similar, de Groot *et al.* (2011) reportó que la inmunorreactividad de SV2A en tejido tumoral y peritumoral tuvo una alta correlación con

la eficacia al levetiracetam en pacientes con glioma y epilepsia. Además, Kaminski *et. al.*, (2009) informaron que el tratamiento previo con levetiracetam tenía una eficacia anticonvulsiva del ~ 50 % en ratones heterocigotos a SV2A sometidos a estimulación eléctrica aguda. Estos resultados, en combinación con los nuestros, sugieren que SV2A media directamente los efectos clínicos del levetiracetam y coloca a la proteína SV2A como un posible predictor de respuesta al tratamiento.

Siendo de suma importancia este último hallazgo debido a su implicación en la clínica, se tendrían que generar alternativas para la cuantificación de la proteína *in vivo* a través de técnicas no invasivas; una excelente opción es la tomografía por emisión de positrones (PET). En la actualidad existen varios radioligandos que detectan la SV2A a través del PET, sin embargo, aún no se logran identificar cambios sutiles generados en capas específicas, por lo que aún se requiere la creación de radioligandos que den una mayor resolución al evaluar la proteína de interés. Finalmente la SV2A podría ser un biomarcador de respuesta al tratamiento con levetiracetam.

9. CONCLUSIONES

La proteína SV2A tuvo importantes modificaciones a lo largo de la generación de la epilepsia, mostrando un aumento en la inmunorreactividad de SV2A en las capas somáticas de la formación hipocámpica durante el *status epilepticus* y este incremento estuvo asociado de manera preferencial con el sistema inhibitor; durante la epilepsia temprana la inmunorreactividad de la proteína regresa a valores basales, mientras que durante la epilepsia tardía, se observa un incremento en la inmunorreactividad de SV2A en capas con conexiones axo-dendríticas, este aumento no pudimos asociarlo con algún neurotransmisor en específico. Durante la epilepsia tardía hay una gran variabilidad en la inmunoreactividad de SV2A, lo cual tuvo una incidencia directa con la respuesta al tratamiento con levetiracetam. Animales con una disminución en los niveles de SV2A no respondieron de manera favorable al fármaco.

10. REFERENCIAS

Althaus AL, Zhang H, Parent JM, 2016. Axonal plasticity of age-defined dentate granule cells in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 86: 187-196.

Amaral D & Lavenex P, 2007. Hippocampal neuroanatomy, in *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, Editors, Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. New York p. 37-114.

Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P, 2007. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* 163: 3-22.

- Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, 2007. The Hippocampal Formation, in *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, Editors, Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. New York p. 3-8.
- Arida RM, Scorza FA, Peres CA, Cavalheiro EA, 1999. The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res* 34 (2-3): 99-107.
- Bajjalieh SM, Peterson K, Shinghal R, Scheller RH, 1992. SV2, a brain synaptic vesicle protein homologous to bacterial transporters. *Science* 257 (5074): 1271-1273.
- Bajjalieh SM, Peterson K, Linial M, Scheller RH, 1993. Brain contains two forms of synaptic vesicle protein 2. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90 (6): 2150-2154.
- Bajjalieh SM, Frantz GD, Weimann JM, McConnell SK, Scheller RH, 1994. Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. *J Neurosci* 14 (9): 5223-5235.
- Bartholome O, Van den Ackerveken P, Sánchez Gil J, de la Brassinne Bonardeaux O, Leprince P, Franzen R, Rogister B, 2017. Puzzling out synaptic vesicle 2 family members functions. *Front Mol Neurosci* 10:148.
- Benedetti MS, Coupez R, Whomsley R, Nicolas JM, Collart P, Baltès E, 2004. Comparative pharmacokinetics and metabolism of levetiracetam, a new anti-epileptic agent, in mouse, rat, rabbit and dog. *Xenobiotica* 34 (3): 281-300.
- Blümcke I, 2009. Neuropathology of focal epilepsies: a critical review. *Epilepsy Behav* 15 (1): 34 - 39.
- Bragina L, Fattorini G, Giovedì S, Melone M, Bosco F, Benfenati F, Conti F, 2012. Analysis of synaptotagmin, SV2, and Rab3 expression in cortical glutamatergic and GABAergic axon terminals. *Front Cell Neurosci* 5:32.
- Buckley K & Kelly RB, 1985. Identification of a transmembrane glycoprotein specific for secretory vesicles of neural and endocrine cells. *J Cell Biol* 100 (4): 1284-1294.
- Carreño M, 2007. Levetiracetam. *Drugs Today (Barc)* 43 (11): 769-794.
- Cha BH, Akman C, Silveira DC, Liu X, Holmes GL, 2004. Spontaneous recurrent seizure following status epilepticus enhances dentate gyrus neurogenesis. *Brain Dev* 26 (6): 394-397.
- Chen LS, Wong JG, Banerjee PK, Snead OC 3rd, 1996. Kainic acid-induced focal cortical seizure is associated with an increase of synaptophysin immunoreactivity in the cortex. *Exp Neurol* 141 (1): 25-31.
- Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF, 1987. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 23 (3): 953-968.
- Correa-Basurto J, Cuevas-Hernández RI, Phillips-Farfán BV, Martínez-Archundia M, Romo-Mancillas A, Ramírez-Salinas GL, Pérez-González ÓA, Trujillo-Ferrara J, Mendoza-Torreblanca JG, 2015. Identification of the antiepileptic racetam binding site in the synaptic vesicle protein 2A by molecular dynamics and docking simulations. *Front Cell Neurosci* 9: 125.
- Crèvecoeur J, Kaminski RM, Rogister B, Foerch P, Vandenplas C, Neveux M, Mazzuferi M, Kroonen J, Poulet C, Martin D, Sadzot B, Rikir E, Klitgaard H, Moonen G, Deprez M, 2014. Expression pattern of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms in patients with temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40 (2): 191-204.
- Crowder KM, Gunther JM, Jones TA, Hale BD, Zhang HZ, Peterson MR, Scheller RH, Chavkin C, Bajjalieh SM, 1999. Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A). *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96 (26): 15268-15273.
- Cruz-Cruz MDR, Gallardo-Elías J, Paredes-Solís S, Legorreta-Soberanis J, Flores-Moreno M, Andersson N, 2017. Factores asociados a epilepsia en niños en México: un estudio caso-control. *Bol Med Hosp Infant Mex* 74 (5): 334-340.

- 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.
- Custer KL, Austin NS, Sullivan JM, Bajjalieh SM, 2006. Synaptic vesicle protein 2 enhances release probability at quiescent synapses. *J Neurosci* 26 (4): 1303-1313.
- DeFelipe Oroquieta J, Arellano JI, Alonso L, Muñoz A, 2002. Neuropatología de la epilepsia del lóbulo temporal. Alteraciones primarias y secundarias de los circuitos corticales y epileptogenicidad. *Rev Neurol* 34 (5): 401-408.
- de Groot M, Aronica E, Heimans JJ., Reijneveld JC, 2011. Synaptic vesicle protein 2A predicts response to levetiracetam in patients with glioma. *Neurology* 77 (6): 532-539.
- Dibbens LM, Hodgson BL, Helbig KL, Oliver KL, Mulley JC, Berkovic SF, Scheffer IE, 2012. Rare protein sequence variation in SV2A gene does not affect response to levetiracetam. *Epilepsy Res* 101 (3): 277-279.
- Escotto-Córdova EA, 1999. Nociones básicas de la electroencefalografía, en *Introducción a la electroencefalografía (EEG) y trazos característicos de los síndromes epilépticos*. Ediciones Psikeé Colección Neurociencias, Editor, Escotto-Córdova EA. México. p. 20-32.
- Falco-Walter JJ, Scheffer IE, Fisher RS, 2018. The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res* 139: 73-79.
- Feany MB, Lee S, Edwards RH, Buckley KM, 1992. The synaptic vesicle protein SV2 is a novel type of transmembrane transporter. *Cell* 70 (5): 861-867.
- Feng G, Xiao F, Lu Y, Huang Z, Yuan J, Xiao Z, Xi Z, Wang X, 2009. Down-regulation synaptic vesicle protein 2A in the anterior temporal neocortex of patients with intractable epilepsy. *J Mol Neurosci* 39 (3): 354-359.
- Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J Jr, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S, 2014. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55 (4): 475-482.
- Fisher RS, 2017. The new classification of seizures by the international league against epilepsy 2017. *Curr Neurol Neurosci Rep* 17 (6): 48
- Friedman MJ & Sharieff GQ, 2006. Seizures in children. *Pediatr Clin North Am* 53 (2): 257-277.
- Fuks B, Gillard M, Michel P, Lynch B, Vertongen P, Leprince P, Klitgaard H, Chatelain P, 2003. Localization and photoaffinity labelling of the levetiracetam binding site in rat brain and certain cell lines. *Eur J Pharmacol* 478 (1): 11-19.
- Glavan G, See RE, Živin M, 2012. Differential patterns of synaptotagmin7 mRNA expression in rats with kainate-and pilocarpine-induced seizures. *PLoS One* 7 (5): e36114.
- Glien M, Brandt C, Potschka H, Voigt H, Ebert U, Löscher W, 2001. Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy. *Epilepsy Res* 46 (2): 111-119.
- Glien M, Brandt C, Potschka H, Löscher W, 2002. Effects of the novel antiepileptic drug levetiracetam on spontaneous recurrent seizures in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 43 (4):350-357.
- Grønberg M, Pavlos NJ, Brunk I, Chua JJ, Münster-Wandowski A, Riedel D, Ahnert-Hilger G, Urlaub H, Jahn R, 2010. Quantitative comparison of glutamatergic and GABAergic synaptic vesicles unveils selectivity for few proteins including MAL2, a novel synaptic vesicle protein. *J Neurosci* 30 (1): 2-12.
- Guzmán-Jiménez DE & Velasco-Monroy AL, 2015. Alteraciones genéticas y pruebas citogenéticas relacionadas con epilepsia de lóbulo temporal mesial. *Revista Mexicana de Neurociencia* 16 (5): 39-47.

Hanaya R, Hosoyama H, Sugata S, Tokudome M, Hirano H, Tokimura H, Kurisu K, Serikawa T, Sasa M, Arita K, 2012. Low distribution of synaptic vesicle protein 2A and synaptotagmin-1 in the cerebral cortex and hippocampus of spontaneously epileptic rats exhibiting both tonic convulsion and absence seizure. *Neuroscience* 221: 12-20.

Jang YS, Lee MY, Choi SH, Kim MY, Chin H, Jeong SW, Kim IK, Kwon OJ, 2004. Expression of B/K protein in the hippocampus of kainite-induced rat seizure model. *Brain Res* 999 (2): 203-211.

Janz R, Goda Y, Geppert M, Missler M, Südhof TC, 1999. SV2A and SV2B function as redundant CA2+ regulators in neurotransmitter release. *Neuron* 24 (4): 1003-1016.

Javidan M, 2012. Electroencephalography in mesial temporal lobe epilepsy: a review. *Epilepsy Res Treat* 2012:637430.

Kaminski RM, Gillard M, Leclercq K, Hanon E, Lorent G, Dasselasse D, Matagne A, Klitgaard H, 2009. Proepileptic phenotype of SV2A-deficient mice is associated with reduced anticonvulsant efficacy of levetiracetam. *Epilepsia* 50 (7): 1729-1740.

Károly N, Mihály A, Dobó E, 2011. Comparative immunohistochemistry of synaptic markers in the rodent hippocampus in pilocarpine epilepsy. *Acta Histochem* 113 (6): 656-662.

Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach HA, Murison R, Moser EI, Moser MB, 2002 Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99 (16): 10825-10830.

Klitgaard H, 2001. Levetiracetam: the preclinical profile of a new class of antiepileptic drugs? *Epilepsia* 42 Suppl 4: 13-18.

Klitgaard H, Matagne A, Nicolas JM, Gillard M, Lamberty Y, De Ryck M, Kaminski RM, Leclercq K, Niespodziany I, Wolff C, Wood M, Hannestad J, Kervyn S, Kenda B, 2016. Brivaracetam: Rationale for discovery and preclinical profile of a selective SV2A ligand for epilepsy treatment. *Epilepsia* 57 (4): 538-548.

Lado FA & Moshé SL, 2008. How do seizures stop? *Epilepsia* 49 (10): 1651-1664.

Lévesque M, Behr C, Avoli M, 2015. The anti-ictogenic effects of levetiracetam are mirrored by interictal spiking and high-frequency oscillation changes in a model of temporal lobe epilepsy. *Seizure* 25: 18-25.

López-Meraz ML, Rocha L, Miquel M, Hernández ME, Toledo R, Coria-Ávila GA, García LI, Pérez CA, Aranda GE, Manzo J, 2009. Conceptos básicos de la epilepsia. *Rev Med UV* 9 (2): 31-37.

Lorigados L, Orozco S, Morales L, Estupiñán B, García I, Rocha L, 2013. Excitotoxicity and neuronal death in epilepsy. *Bioteología Aplicada* 30 (1): 9-16.

Löscher W, Gillard M, Sands ZA, Kaminski RM, Klitgaard H, 2016. Synaptic vesicle glycoprotein 2A ligands in the treatment of epilepsy and beyond. *CNS Drugs* 30 (11): 1055-1077.

Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh SM, Matagne A, Fuks B, 2004. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (26): 9861-9866.

Lynch BA, Matagne A, Brännström A, von Euler A, Jansson M, Hauzenberger E, Söderhäll JA, 2008. Visualization of SV2A conformations in situ by the use of protein tomography. *Biochem Biophys Res Commun* 375 (4): 491-495.

Lynch JM, Tate SK, Kinirons P, Weale ME, Cavalleri GL, Depondt C, Murphy K, O'Rourke D, Doherty CP, Shianna KV, Wood NW, Sander JW, Delanty N, Goldstein DB, Sisodiya SM, 2009. No major role of common SV2A variation for predisposition or levetiracetam response in epilepsy. *Epilepsy Res* 83 (1): 44-51.

Margineanu DG, Matagne A, Kaminski RM, Klitgaard H, 2008. Effects of chronic treatment with levetiracetam on hippocampal field responses after pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Res Bull* 77(5): 282-285.

- Matveeva EA, Vanaman TC, Whiteheart SW, Slevin JT, 2007. Asymmetric accumulation of hippocampal 7S SNARE complexes occurs regardless of kindling paradigm. *Epilepsy Res* 73 (3): 266-274.
- Matveeva EA, Vanaman TC, Whiteheart SW, Slevin JT, 2008. Levetiracetam prevents kindling-induced asymmetric accumulation of hippocampal 7S SNARE complexes. *Epilepsia* 49 (10): 1749-1758.
- Meehan AL, Yang X, McAdams BD, Yuan L, Rothman SM, 2011. A new mechanism for antiepileptic drug action: vesicular entry may mediate the effects of levetiracetam. *J Neurophysiol* 106 (3): 1227-1239.
- Meehan AL, Yang X, Yuan LL, Rothman SM, 2012. Levetiracetam has an activity-dependent effect on inhibitory transmission. *Epilepsia* 53 (3): 469-476.
- Mendoza-Torreblanca JG, Vanoye-Carlo A, Phillips-Farfán BV, Carmona-Aparicio L, Gómez-Lira G, 2013. Synaptic vesicle protein 2A: basic facts and role in synaptic function. *Eur J Neurosci* 38 (11): 3529-3539.
- Moser MB & Moser EI, 1998. Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *J Neurosci* 18 (18): 7535-7542.
- Moser MB & Moser EI, 1998. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8 (6): 608-619.
- Naylor DE, Liu H, Niquet J, Wasterlain CG, 2013. Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus. *Neurobiol Dis* 54: 225-238.
- Noyer M, Gillard M, Matagne A, Hénichart JP, Wülfert E, 1995. The novel antiepileptic drug levetiracetam (ucb L059) appears to act via a specific binding site in CNS membranes. *Eur J Pharmacol* 286 (2): 137-146.
- Nowack A, Yao J, Custer KL, Bajjalieh SM, 2010. SV2 regulates neurotransmitter release via multiple mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 299 (5): C960-967.
- Nowack A, Malarkey EB, Yao J, Bleckert A, Hill J, Bajjalieh SM, 2011. Levetiracetam reverses synaptic deficits produced by overexpression of SV2A. *PLoS One* 6 (12): e29560.
- Ohno Y, Ishihara S, Terada R, Kikuta M, Sofue N, Kawai Y, Serikawa T, Sasa M, 2009. Preferential increase in the hippocampal synaptic vesicle protein 2A (SV2A) by pentylentetrazole kindling. *Biochem Biophys Res Commun* 390 (3): 415-420.
- Oláh E, Bacsói G, Fekete J, Sharma VK, 2012. Determination of ng/mL levetiracetam using ultra-high-performance liquid chromatography-photodiode absorbance. *J Chromatogr Sci* 50 (3): 253-258.
- Olivares-Hernández JD, Juárez-Aguilar E, García-García F, 2015. El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje.
- OMS. *Epilepsia*, 2017.
- Özkara C & Aronica E, 2012. Hippocampal sclerosis. *Handb Clin Neurol* 108: 621-639.
- Panayiotopoulos CP, 2011. The new ILAE report on terminology and concepts for organization of epileptic seizures: a clinician's critical view and contribution. *Epilepsia* 52 (12): 2155-2160
- Paxinos G & Watson C, 2007. Sagittal sections, in *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th ed. London, Elsevier, Editors, Paxinos G & Watson C.
- Pichardo-Macías LA, Contreras-García IJ, Zamudio SR, Mixcoha E, Mendoza-Torreblanca JG, 2016. Synaptic vesicle protein 2A as a novel pharmacological target with broad potential for new antiepileptic drugs, in *Antiepileptic Drug Discovery: Novel Approaches, Methods in Pharmacology and Toxicology*. Springer, Editors, Talevi A & Rocha L. p. 53-81.
- Racine RJ, 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32 (3): 281-294.

- Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Hirsch E, Jain S, Mathern GW, Moshé SL, Nordli DR, Perucca E, Tomson T, Wiebe S, Zhang YH, Zuberi SM, 2017. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 58 (4): 512-521.
- Scorza CA, Garrido Y del C, Arida RM, Amado D, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti Mda G, 2003. Levels of the synaptic protein X11 alpha/mint1 are increased in hippocampus of rats with epilepsy. *Epilepsy Res* 57 (1): 49-57.
- Scorza FA, Arida RM, Naffah-Mazzacoratti Mda G, Scerni DA, Calderazzo L, Cavalheiro EA, 2009. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *An Acad Bras Cienc* 81 (3): 345-365.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. México: SAGARPA, 2001.
- Spruston N & McBain C, 2007. Structural and Functional Properties of Hippocampal Neurons, in *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, Editors, Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. New York p. 133-201.
- Stafstrom CE, 2004. An Introduction to Seizures and Epilepsy; Cellular Mechanisms Underlying Classification and Treatment, in *Epilepsy and the Ketogenic Diet*. H. Press, Editors, Rho JM & Stafstrom CE. Totowa New Jersey p. 3-30.
- Stafstrom CE, 2010. Pathophysiological Mechanisms of Seizures and Epilepsy: A Primer, in *Epilepsy: Mechanisms, Models, and Translational Perspectives*. CRC Press, Editors, Rho JM, Sankar R, Stafstrom CE. p. 3-17.
- Swaroop HS, Ananya C, Nithin K, Jayashankar CA, Satish Babu HV, Srinivas BN, 2013. Levetiracetam: A Review of its use in the treatment of epilepsy. *Int J Med Biomed Res* 2 (3):166-172.
- Taupin P, 2007. The hippocampus, in *The hippocampus. Neurotransmission and plasticity in the nervous system*. Nova Science Publisher, Inc., Editor, Taupin P. p. 3-12.
- Thom M, 2014. Epilepsy pathology in *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, Volume 2. Elsevier, Editors, Aminoff MJ & Daroff RB. p. 136-141.
- Toering ST, Boer K, de Groot M, Troost D, Heimans JJ, Spliet WG, van Rijen PC, Jansen FE, Gorter JA, Reijneveld JC, Aronica E, 2009. Expression patterns of synaptic vesicle protein 2A in focal cortical dysplasia and TSC-cortical tubers. *Epilepsia* 50 (6): 1409-1418.
- Tokudome K, Okumura T, Shimizu S, Mashimo T, Takizawa A, Serikawa T, Terada R, Ishihara S, Kunisawa N, Sasa M, Ohno Y, 2016. Synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) regulates kindling epileptogenesis via GABAergic neurotransmission. *Sci Rep* 6: 27420.
- Tokudome K, Okumura T, Terada R, Shimizu S, Kunisawa N, Mashimo T, Serikawa T, Sasa M, Ohno Y, 2016. A missense mutation of the gene encoding synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) confers seizure susceptibility by disrupting amygdalar synaptic GABA release. *Front Pharmacol* 7: 210.
- . Review of levetiracetam, with a focus on the extended release formulation, as adjuvant therapy in controlling partial-onset seizures. *Neuropsychiatr Dis Treat* 5: 467-476.
- Upreti C, Otero R, Partida C, Skinner F, Thakker R, Pacheco LF, Zhou ZY, Maglakelidze G, Velíšková J, Velíšek L, Romanovicz D, Jones T, Stanton PK, Garrido-Sanabria ER, 2012. Altered neurotransmitter release, vesicle recycling and presynaptic structure in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain* 135 (Pt 3): 869-885.
- Ure JA & Perassolo M, 2000. Update on the pathophysiology of the epilepsies. *J Neurol Sci* 177 (1): 1-17
- Van Liefferinge J, Jensen CJ, Albertini G, Bentea E, Demuyser T, Merckx E, Aronica E, Smolders I, Massie A, 2015. Altered vesicular glutamate transporter expression in human temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Neurosci Lett* 590: 184-188.

van Vliet EA, Aronica E, Redeker S, Boer K, Gorter JA, 2009. Decreased expression of synaptic vesicle protein 2A, the binding site for levetiracetam, during epileptogenesis and chronic epilepsy. *Epilepsia* 50 (3): 422-433.

Venkatesan K, Alix P, Marquet A, Doupagne M, Niespodziany I, Rogister B, Seutin V, 2012. Altered balance between excitatory and inhibitory inputs onto CA1 pyramidal neurons from SV2A-deficient but not SV2B-deficient mice. *J Neurosci Res* 90 (12): 2317-2327.

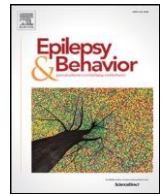
Wasterlain CG, Naylor DE, Liu H, Niquet J, Baldwin R, 2013. Trafficking of NMDA receptors during status epilepticus: therapeutic implications. *Epilepsia* 54: Suppl 6: 78-80.

Westbrook GL, 2000. Seizures and Epilepsy, in *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill, Editors, Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. New York, 4th edition. p. 912-936.

Yang XF, Weisenfeld A, Rothman SM, 2007. Prolonged exposure to levetiracetam reveals a presynaptic effect on neurotransmission. *Epilepsia* 48 (10): 1861-1869.

Yao J, Nowack A, Kensel-Hammes P, Gardner RG, Bajjalieh SM, 2010. Cotrafficking of SV2 and synaptotagmin at the synapse. *J Neurosci* 30 (16): 5569-5578.

Yusta-Izquierdo A, 2005. Crisis convulsivas. Concepto, clasificación y etiología. *Emergencias* 17: S68-S73.



Differential expression of synaptic vesicle protein 2A after status epilepticus and during epilepsy in a lithium-pilocarpine model

Itzel Jatziri Contreras-García^{a,b,1}, Luz Adriana Pichardo-Macías^{a,c}, César Emmanuel Santana-Gómez^d, Karla Sánchez-Huerta^a, Rogelio Ramírez-Hernández^a, Beatriz Gómez-González^e, Luisa Rocha^d, Julieta G. Mendoza Torreblanca^{a,*}

^a *Instituto Nacional de Pediatría, Subdirección de Medicina experimental, Laboratorio de Neurociencias, México*

^b *Posgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México*

^c *Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Departamento de Fisiología, México*

^d *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, del Instituto Politécnico Nacional, Sede Sur México, Departamento de Farmacobiología*

^e *Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Area of Neurosciences, México*

a r t i c l e

Lithium-pilocarpine SV2A protein Status epilepticus

Temporal lobe epilepsy VGLUT 1

VGAT

Article history:

Received 1
February 2018

Revised 4 July
2018

Accepted 17
August 2018

Available online
xxxx

Keywords:

abstract

Synaptic vesicle protein 2A (SV2A) has become an attractive target of investigation because of its role in the pathophysiology of epilepsy; SV2A is expressed ubiquitously throughout the brain in all nerve terminals independently of their neurotransmitter content and plays an important but poorly defined role in neurotransmission.

on. Previous studies have shown that modifications in the SV2A protein expression could be a direct consequence of disease severity. Furthermore, these SV2A modifications may depend on specific changes in the nerve tissue following the induction of epilepsy and might be present in both excitatory and inhibitory terminals. Thus, we evaluated SV2A protein expression throughout the hippocampi of lithium-pilocarpine rats after *status epilepticus* (SE) and during early and late epilepsy. In addition, we determined the γ -aminobutyric acid (GABA)ergic or glutamatergic nature associated with SV2A modifications. Wistar rats were treated with lithium-pilocarpine to induce SE and subsequently were shown to present spontaneous recurrent seizures (SRS). Later, we conducted an exhaustive semi-quantitative analysis of SV2A optical density (OD) throughout the hippocampus by immunohistochemistry. Levels of the SV2A protein were substantially increased in layers formed by principal neurons after SE, mainly because of GABAergic activity. No changes were observed in the early stage of epilepsy. In the late stage of epilepsy, there were minor changes in SV2A OD compared with the robust modifications of SE; however, SV2A protein expression generally showed an increment reaching significant differences in two dendritic layers and hilus, without clear modifications of GABAergic or glutamatergic systems. Our results suggest that the SV2A variations may depend on several factors, such as neuronal activity, and might appear in both excitatory and inhibitory systems depending on the epilepsy stage.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Synaptic vesicle protein 2A (SV2A) is a 12-transmembrane glycoprotein ~82.7 kDa; it is a member of a conserved protein family in vertebrates consisting of 3 isoforms: SV2A, SV2B, and SV2C [1–4]; SV2A is present in all synaptic vesicles in neuronal cells, regardless of their neurotransmitter content (excitatory or inhibitory), and in endocrine cells [5,6]. Although the exact function of SV2A remains undefined, studies in SV2A knock-out (KO) mice propose that this protein participates in vesicular recycling in two possible processes:

priming and endocytosis [7,8]. Interestingly, no alteration has been observed in miniature

* Corresponding author.

E-mail address: julietamt14@hotmail.com (J.G. Mendoza Torreblanca).

1 First author.

excitatory and inhibitory postsynaptic currents, indicating that SV2A regulates action potential-dependent neurotransmitter release without affecting basal release [7—12]. Additionally, it has also been observed that the inhibitory system could be more sensitive to SV2A deletion; then, there may be a closer association between SV2A and GABA than with the glutamatergic system [12,13].

Recently, it has been postulated that the SV2A protein could have an important role in

epilepsy because it is the brain-binding site of the anticonvulsant and antiepileptogenic drug levetiracetam (LEV) and its structural analogs [14—17]. Another important point is that 100% of SV2A homozygous KO animals experience severe generalized motor seizures, and all die between P12 and P23 [11]. In addition, 24% of heterozygous animals present spontaneous recurrent seizures (SRS) [11]; furthermore, all of them are more susceptible to the generation of seizures in different acute seizure models [18]

Table 1

Animal groups.

Group	Experimental conditions	Lithium-pilocarpine	Sacrifice and perfusion
1	SE (n = 5)	Yes	60 min after stopping SE
2	Ctrl (n = 5)	No	With the SE group
3	EEPI (n = 5)	Yes	10 days
4	Ctrl (n = 5)	No	With the EEPI group
5	LEPI (n = 6)	Yes	56 days
6	Ctrl (n = 4)	No	With the LEPI group

Previous studies in patients with temporal lobe epilepsy (TLE), one of the more frequent partial epileptic syndromes, have reported decreased levels of SV2A protein throughout the hippocampus, mainly in layers of severe neuronal loss, except for the inner molecular (Mol) layer of the dentate gyrus (DG), which showed an increase SV2A immunoreactivity (IR), explained by the sprouting of mossy fibers [19,20]. With respect to animal models of TLE, the data are not consistent; however, in a model of tetanic stimulation-induced epileptic rats, during epileptogenesis and chronic epilepsy, the SV2A levels also decreased in most hippocampal layers [19]. These results were supported by a

microarray study that showed a progressive reduction of SV2A gene expression in the same model [21].

These data point to a decrease in SV2A that could be a direct consequence of disease severity (even, recently, it has also been proposed as a biomarker of neurodegeneration) [22,23]. However, this issue has not been explored in TLE rats induced by lithium-pilocarpine, one of the most used animal models because it reproduces the changes occurring in the hippocampi of patients with this neurological disorder with high fidelity. Then, we decided to exhaustively quantify the levels of SV2A in the hippocampi of TLE rats. In addition, we also evaluated whether changes in the SV2A protein were involved with the inhibitory or excitatory systems evaluating the IR of vesicular GABA transporter (VGAT) and vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1).

2. Methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (250–300 g) were obtained from Envigo (Mexico). All rats were housed under controlled conditions at 20 ± 2 °C, with a 12-h light/12-h dark cycle (6:00 am/6:00 pm) with food and water ad

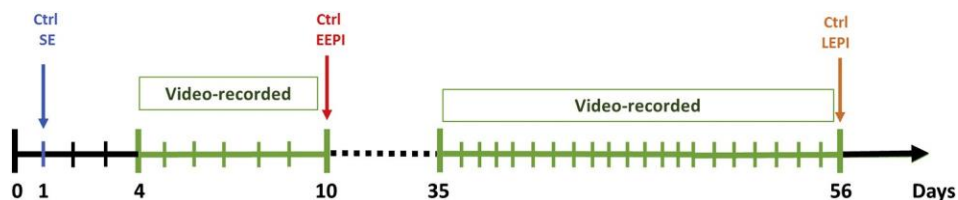


Fig. 1. Experimental design. *Status epilepticus* (SE) was induced on day 1 in male Wistar rats by administering lithium-pilocarpine. Rats of the SE group and their controls (Ctrl) were sacrificed 60 min after stopping SE with diazepam (blue arrow). From 4 to 10 days post-SE, the early epileptic group (EEPI) was video-monitored during the light period (8:00 am– 6:00 pm) to observe the emergence of SRS and to record their frequency. The EEPI group and its Ctrl group were sacrificed on day 10 (red arrow). From 35 to 56 days post-SE, late epileptic rats (LEPI) were video-monitored during the light phase and, together with the corresponding Ctrl group, were sacrificed on day 56 (orange arrow). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

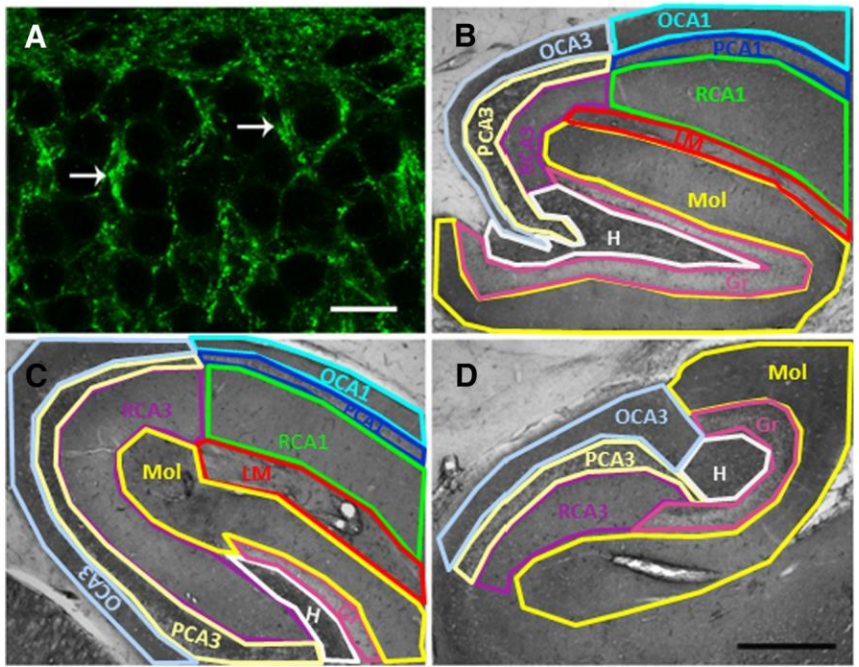


Fig. 2. Photomicrographs of SV2A-IR in sagittal sections of the hippocampus. (A) SV2A expression in the PCA1 layer showing punctate labeling around the soma of pyramidal neurons (white arrows). Photomicrographs show the anterior (B) and posterior (C) portion of the dorsal hippocampus and the ventral hippocampus (D). The hippocampal layers include the OCA1 (cyan), RCA1 (green), PCA1 (blue), OCA3 (light blue), RCA3 (magenta), PCA3 (beige), LM (red), Mol (yellow), Gr (pink) and hilus (H; white). Scale bars: A 15 μm; D 200 μm, also applies to B and C. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

libitum. Animals were randomly assigned to 1 of the 6 groups (Table 1 and Fig. 1): the *status epilepticus* (SE) group, the early epileptic group (EEPI), the late epileptic group (LEPI), and three control groups (Ctrl; with saline solution at each time point). The onset of SE was determined as the time at which the animals showed seizures continuously for more than 2 min without recovery between them [24], and epileptic animals were defined as rats that showed SRS after SE induction. Animals that did not present SRS were excluded from the study. All procedures followed the NIH Guide for the Care and Use of Experimental Animals and the Mexican official Norm of the Secretaría de Agricultura (SAGARPA NOM-062-Z00-1999) published in 2001. The protocols were approved by the Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio of the Instituto Nacional de Pediatría.

2.2. Induction of SE and post-SE care

All experimental animals received lithium chloride (127 mg/kg, i.p.; Sigma-Aldrich) 19 h before the administration of pilocarpine [25–27]. Subsequently, rats were treated with methyl scopolamine bromide (1 mg/kg, i.p.; Sigma-Aldrich) 30 min prior to pilocarpine treatment, and finally, a dose of pilocarpine hydrochloride (30 mg/kg, i.p.; Sigma-Aldrich) was administered. Ninety minutes after SE onset, the animals received an injection of diazepam (5 mg/kg, i.m.; PISA) and were placed on an ice bed for 1 h to reduce the hyperthermia generated during SE; 8 h after SE stopped, animals from the epileptic groups received a second dose of diazepam (5 mg/kg, i.m.; PISA) and an injection of 0.9% NaCl (5 ml, s.c.) for rehydration. Rats were housed at 17 °C overnight.

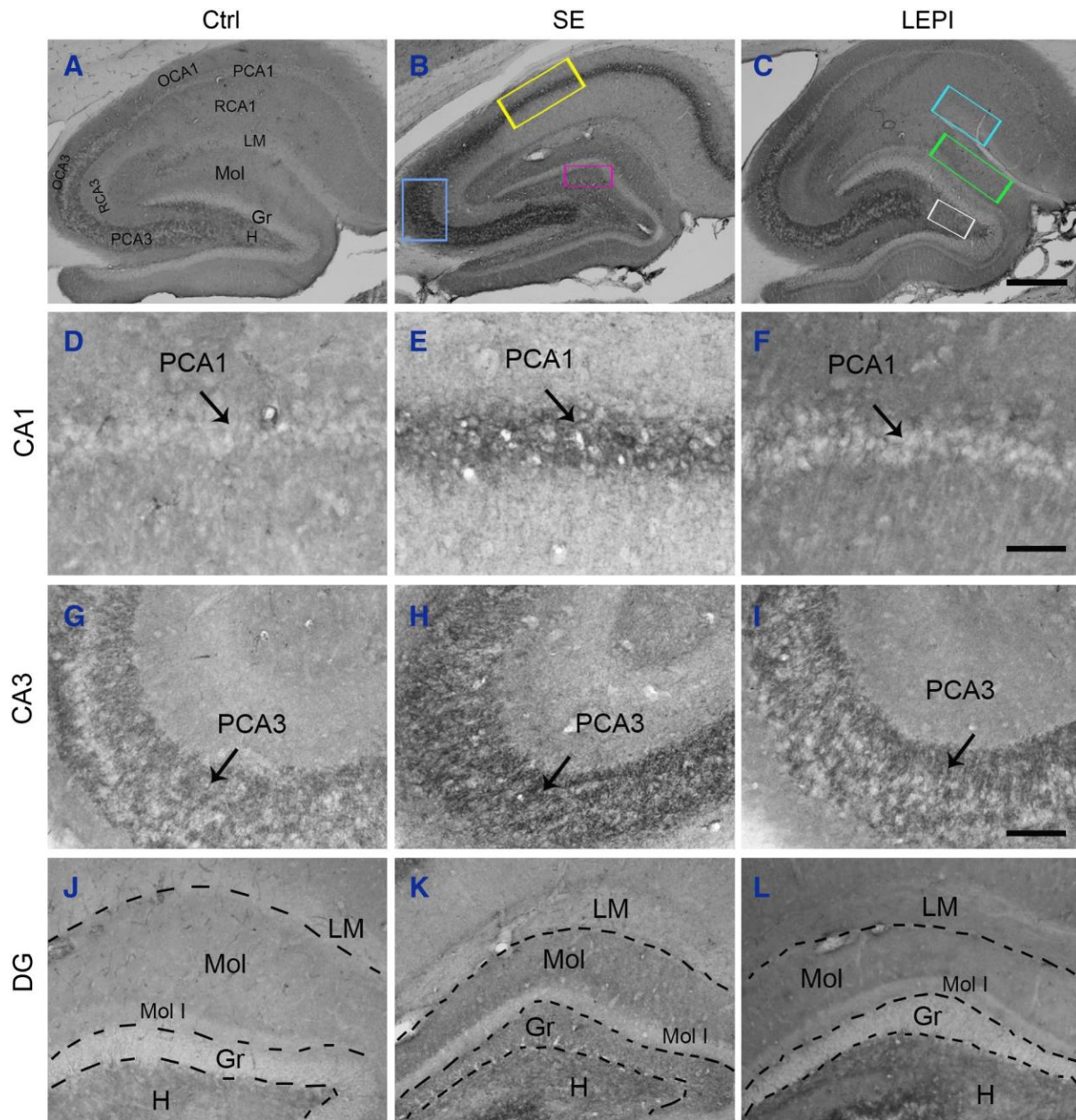


Fig. 3. Principal variations in SV2A-IR in different regions of the hippocampus. Photomicrographs illustrate the SV2A-IR in sagittal sections of the dorsal anterior hippocampus of the Ctrl (A, D, G, and J), SE (B, E, H, and K) and LEPI (C, F, I, and L) groups. (B) In the SE group, SV2A-IR increased significantly in PCA1 (yellow square and E, arrow), PCA3 (blue square and H, arrow) and Gr (magenta square and K) in the hippocampus. No changes were observed in the EEPI group compared with the Ctrl group (not shown). (C) In the LEPI group, changes in SV2A-IR were observed in the LM (cyan square), Mol (green square) and hilus (H; white square). Scale bars: C 500 μ m; also applies to A and B; F 200 μ m, also applies D and E; I 150 μ m also applies G—L. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Subsequently, rats were fed with nutritional supplement dissolved in sterilized water until all rats returned to eating standard pellets (~ 3 days; [28]).

2.3. Behavioral video-monitoring of SRS

Spontaneous recurrent seizures were rated according to the Racine scale by evaluating the animal's behavior, and the frequencies of SRS rated between stages 3 to 5 of the Racine scale were quantified [29]. Because of the higher frequency of SRS during the diurnal period (according to our previous unpublished observations and several reports [27, 30]), video monitoring was performed from 8:00 am to 6:00 pm. The EEPI group was recorded from days 4 to 10 post-SE, and the LEPI group was recorded from days 35 to 56 post-SE (Fig. 1).

Videos were analyzed by trained observers, and behavioral video monitoring was obtained through a digital video recorder (DVR) system with 4 cameras (Steren model CCTV-970). All video recordings were reviewed manually with the H.264 PlayBack program for Windows at 4 × speed (4 times normal speed) to detect the frequency of SRS. Once a seizure was detected, the videotape was rewound to the beginning of the SRS and examined at real-time speed as previously described [28].

2.4. Tissue sample collection and processing

On the day of sacrifice, all animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (63 mg/ml, i.p.) and transcardially perfused with NaCl 0.9% and paraformaldehyde 4% in a 0.1-M phosphate buffer (PB, pH 7.4). Then, the rats were decapitated, and their brains were removed and postfixed in the same fixative for 24 h at 4 °C. Next, brains were cryoprotected by immersion in solutions of sucrose (20–30%) until they sank. Subsequently, the brains were frozen in 2-methylbutane

that had been prechilled with dry ice and stored at –80 °C. Afterwards, serial sagittal sections (40-µm thick) from entire hippocampi were cut using a cryostat (Cryocut 1800), and tissues were stored in cryoprotectant solution until use.

2.5. Immunohistochemistry and double immunofluorescence

An immunohistochemistry (IHC) procedure was performed on free-floating hippocampal sections; both Ctrl and experimental groups were processed at the same time with the same conditions. The sections were continuously stirred at room temperature to detect the IR of SV2A, VGLUT1, and VGAT. Between each reaction, 3 washes were performed with PB for 15 min. The process was initiated by incubating the sections with hydrogen peroxide (3% H₂O₂; Sigma-Aldrich) for 30 min. After washing, the tissue was incubated in fetal calf serum (FCS, 5% in PB; Gibco) for 1 h. Then, the slices were incubated overnight with primary antibodies diluted in FCS: SV2A (1:500, goat IgG, Santa Cruz, sc-11936), VGAT (1:750, rabbit IgG, Sigma, V5764) or VGLUT1 (1:750, mouse IgG, Santa Cruz, sc-377425). On the next day, sections were washed and incubated for 2 h with their respective biotinylated secondary antibodies diluted in FCS: horse anti-goat (1:1000, Vector, BA-9500), goat anti-rabbit (1:500, Vector, BA-1000), or goat anti-mouse (1:500, Vector, BA-9200). Next, slices were washed and incubated with avidin-biotinylated peroxidase (Vectastain ABC Elite Standard Kit, Vector PK-6100) for 1 h. Staining was then revealed by incubating the sections with 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Vector SK-4100). Finally, sections were mounted on gelatin-coated slides and cover-slipped with Cytoseal mounting media as previously reported [31].

The double immunofluorescence procedure was performed in the same conditions mentioned above, but the slices were

incubated with the primary antibodies *I.J. Contreras-García et al. / Epilepsy & Behavior 88 (2018) 787–794* Cruz, sc-376234) and VGAT (rabbit IgG, ²⁸⁹ diluted in FCS, SV2A (mouse IgG, Santa Cruz, sc-376234) and VGAT (rabbit IgG, Sigma, V5764) or SV2A (goat IgG,

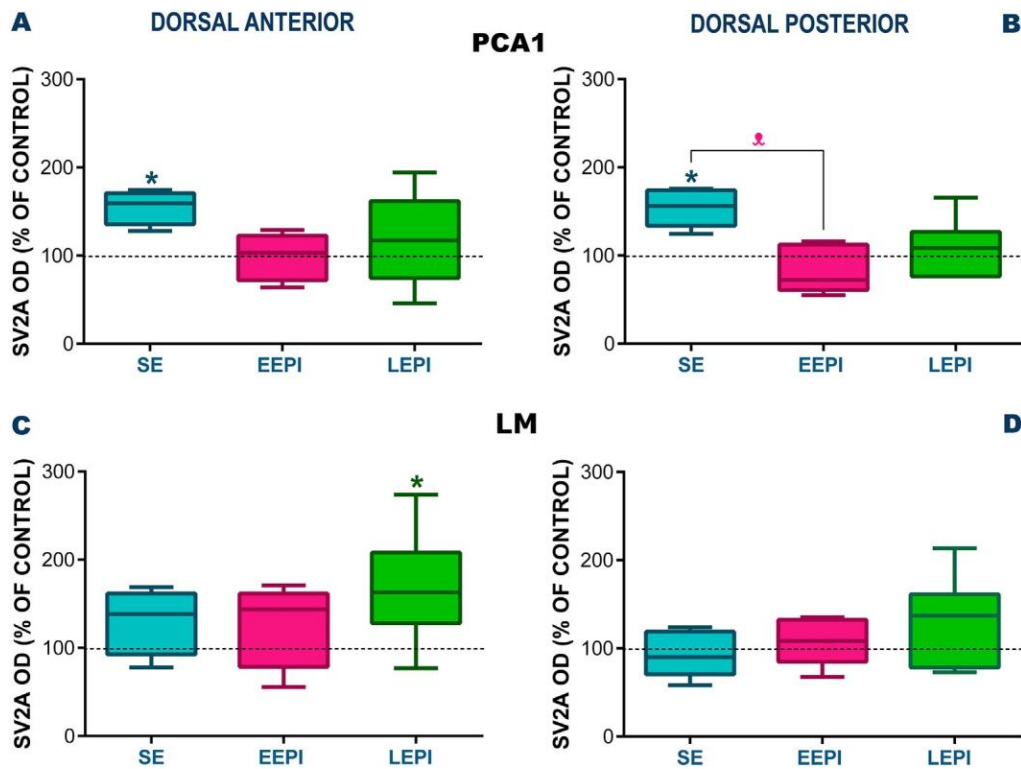


Fig. 4. Box and whisker plots depict changes in SV2A expression in the PCA1 and LM layers of the dorsal anterior (A and C) and dorsal posterior (B and D) hippocampal regions. Values are expressed as percentages of change in the SE, EEPI, and LEPI groups compared with the Ctrl group (dotted lines). Data represent the minimum, median, and maximum values of the normalized OD values of the protein. Kruskal—Wallis one-way analysis of variance of ranks followed by Dunn's method: $p < 0.050$ *compared with the Ctrl group and α compared with the experimental group. SE $n = 5$; EEPI $n = 5$; LEPI $n = 6$.

Santa Cruz, sc-11936) and VGLUT1 (mouse IgG, Santa Cruz, sc-377425) overnight; all antibodies were used 1:200 except for VGLUT1, which was 1:300. On the next day, sections were washed and incubated for 2 h with their respective secondary antibodies diluted in FCS: donkey anti-mouse Alexa 488 (Invitrogen, A-21202) and donkey anti-rabbit Alexa 555 (Invitrogen, A-31572) or chicken anti-goat Alexa 594 (Invitrogen, A-21468) and donkey anti-mouse Alexa 488 (Invitrogen, A-21202); all secondary antibodies were used 1:500. Finally, sections were mounted on gelatin-coated slides and cover-slipped with DAKO fluorescent mounting medium.

2.6. Quantification of SV2A, VGAT, and VGLUT1 proteins

For the semiquantitative analysis of SV2A expression throughout the hippocampus, 1 of 12 sections was chosen by systematic random sampling from the serial sections obtained from each animal. Then, images were obtained with a 4× objective, and the signal intensity of SV2A-IR was analyzed by recording the OD using the NIH ImageJ v1.43m program. The quantitative data were analyzed by investigators who were blinded to the treatments, and the values are expressed as OD units. Each OD value was corrected by subtracting the background from each section. The SV2A OD was quantified in the anterior (bregma: from AP: -1.7; ML: 0.18; DV: -3.7 to AP: -2.1; ML: 2.62; DV: -3.6 mm) and posterior portions (bregma: from AP: -2.6; ML: 2.9; DV: -4.0 to AP: -3.7; ML: 4.6; DV: -6.3 mm) of the dorsal hippocampus and in the ventral hippocampus (bregma: from AP: -4.3; ML: 2.9; DV: -8.7 to AP: -4.0; ML: 4.6; DV: -8.8 mm) [32–35]. Ten layers were identified in the anterior and posterior dorsal hippocampus: the stratum oriens of CA1 and CA3 (OCA1 and OCA3), the stratum radiatum of CA1 and CA3 (RCA1 and RCA3), the pyramidal cell layers of CA1 and CA3 (PCA1 and PCA3), the stratum lacunosum-moleculare (LM), the molecular layer (Mol),

the granular layer (Gr), and the hilus. In the ventral hippocampal region, only the OCA3, RCA3, PCA3, Mol, Gr, and hilus were defined (Fig. 2B, C and D). Because we were not able to separate the SV2A-IR in the PCA3 from stratum lucidum, both layers were

analyzed together for all markers. The semiquantitative analysis of VGAT and VGLUT1-IR was performed in the same conditions mentioned above, but only in the anterior portion of dorsal hippocampus.

2.7. Statistical analyses

Spontaneous recurrent seizures frequencies are expressed as the means \pm standard errors of the mean (SEM). The SV2A OD data are represented as medians \pm minimum and maximum values. Multiple comparisons were performed using Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks followed by Dunn’s Method. The VGAT and VGLUT1 OD data are represented as the means \pm SEM. Student’s *t*-tests were performed to compare equivalent groups (the data set passed the normality tests). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Induction of SE

In our conditions, 100% of the animals treated with lithium-pilocarpine presented behavioral alterations 10 min after pilocarpine administration, and rats showed SE within the first hour after pilocarpine administration. Furthermore, 14% of the animals died within the first 15 days post-SE despite the care mentioned above; notably, this mortality rate is lower than that reported by others [25,30].

3.2. Analysis of SRS in epileptic rats

Of the 86% of animals that survived, 76.2% presented at least 1 seizure during the video-monitoring periods, showing an average of 5 ± 1.136 (mean \pm SEM) total seizures, with a minimum of 1 seizure and a maximum of 10 seizures per animal and a higher incidence of behavioral seizures observed between 11:00 am and 2:00 pm. These parameters are consistent with previous reports showing a high variability in

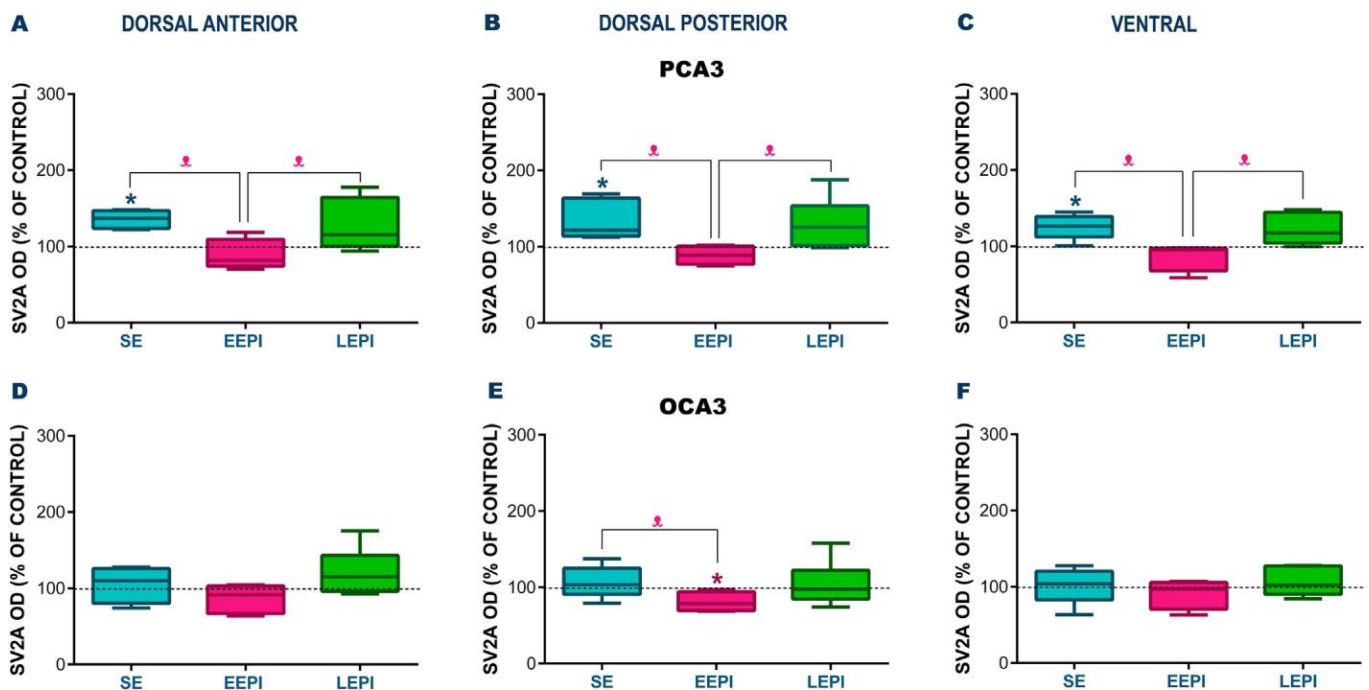


Fig. 5. Box and whisker plots depict variations in SV2A expression in the PCA3 and OCA3 in the dorsal anterior (A and D), dorsal posterior (B and E), and ventral (C and F) hippocampal regions. Values are expressed as percentages of change in the SE, EEPI, and LEPI groups compared with the Ctrl group (dotted lines). Data represent the normalized minimum, median, and maximum values of the OD values of the protein. Kruskal—Wallis one-way analysis of variance of ranks followed by Dunn's method: p b 0.050 *compared with the Ctrl group and \bullet compared with the experimental group. SE n = 5; EEPI n = 5; LEPI n = 6.

seizure frequency between animals and the peak incidence of seizures during the light period [28,30,36].

3.3. *SV2A-IR in the hippocampi of the Ctrl group*

The SV2A-IR showed different arrangements across all hippocampal layers because of its laminar organization, resulting in well-defined expression patterns. In the layers where the bodies of the principal neurons (granular and pyramidal) are located, a punctate SV2A-IR is observed surrounding the somas but is absent in the cell body (i.e., Fig. 2A), while in the layers where neuronal dendrites predominate, i.e., RCA3, RCA1, OCA3, OCA1, Mol, LM (Fig. 2B–D), the SV2A-IR is diffuse, observing dispersed points that comprise the whole layer. In the hilar region, the mossy fibers showed a fiber-like staining that extends to the stratum lucidum, where the axons of the granular cells surround the soma of the PCA3. Notably, the highest SV2A OD was observed in the stratum lucidum and hilar layers (Fig. 2B–D). Because there were no significant differences among the three Ctrl groups, the SV2A OD values from these groups were averaged and fixed at 100% and are represented on the dotted lines of each graph (see below).

3.4. *Variations in SV2A levels after SE*

The most evident change in SV2A levels in our experimental groups was observed after SE, showing a substantial increase (from 122% to 214%) in the layers formed by principal neurons, i.e., the PCA1 (Figs. 3B yellow square and 3E; 4A and B), PCA3 (Figs. 3B blue square and 3H; 5A, B, and C) and Gr (Figs. 3B magenta square and 3K; 6D, E, and F) compared with Ctrl rats. No significant differences in SV2A-IR were observed in the LM, Mol, hilus, OCA3, OCA1, RCA1, or RCA3 layers compared with the Ctrl group.

3.5. *Variations in SV2A levels during early epilepsy*

No changes were observed in the EEPI group (10 days post-SE) compared with the Ctrl group. However, important variations resulted from the increase in SV2A-IR during SE and its subsequent decrease 10 days after, reaching significant differences in the PCA1 (Fig. 4B), OCA3 (Fig. 5E), and Gr (Fig. 6E) of the dorsal posterior hippocampus. Notably, in the PCA3, significant differences were observed in the three hippocampal regions (Fig. 5A, dorsal anterior; 5B, dorsal posterior; and 5C ventral).

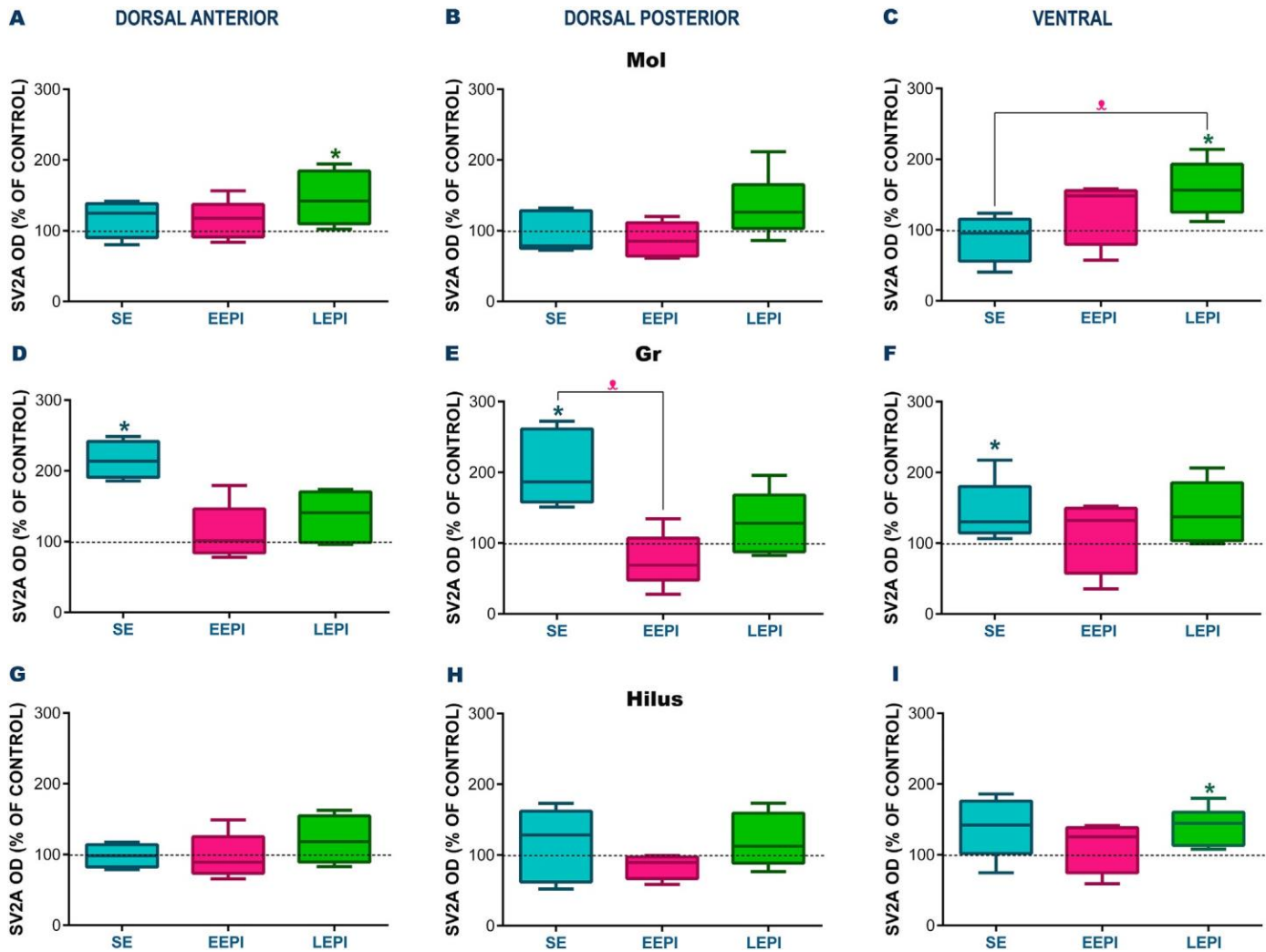


Fig. 6. Box and whisker plots depict changes in SV2A expression in the DG layers of the dorsal anterior (A, D, and G), dorsal posterior (B, E, and H), and ventral (C, F, and I) hippocampal regions. Values are expressed as percentages of change in the SE, EEPI, and LEPI groups compared with the Ctrl group (dotted lines). Data represent the normalized minimum, median, and maximum values of the OD values of the protein. Kruskal—Wallis one-way analysis of variance of ranks followed by Dunn's method: $p < 0.050$ *compared with the Ctrl group and ⚡ compared with the experimental group. SE $n = 5$; EEPI $n = 5$; LEPI $n = 6$.

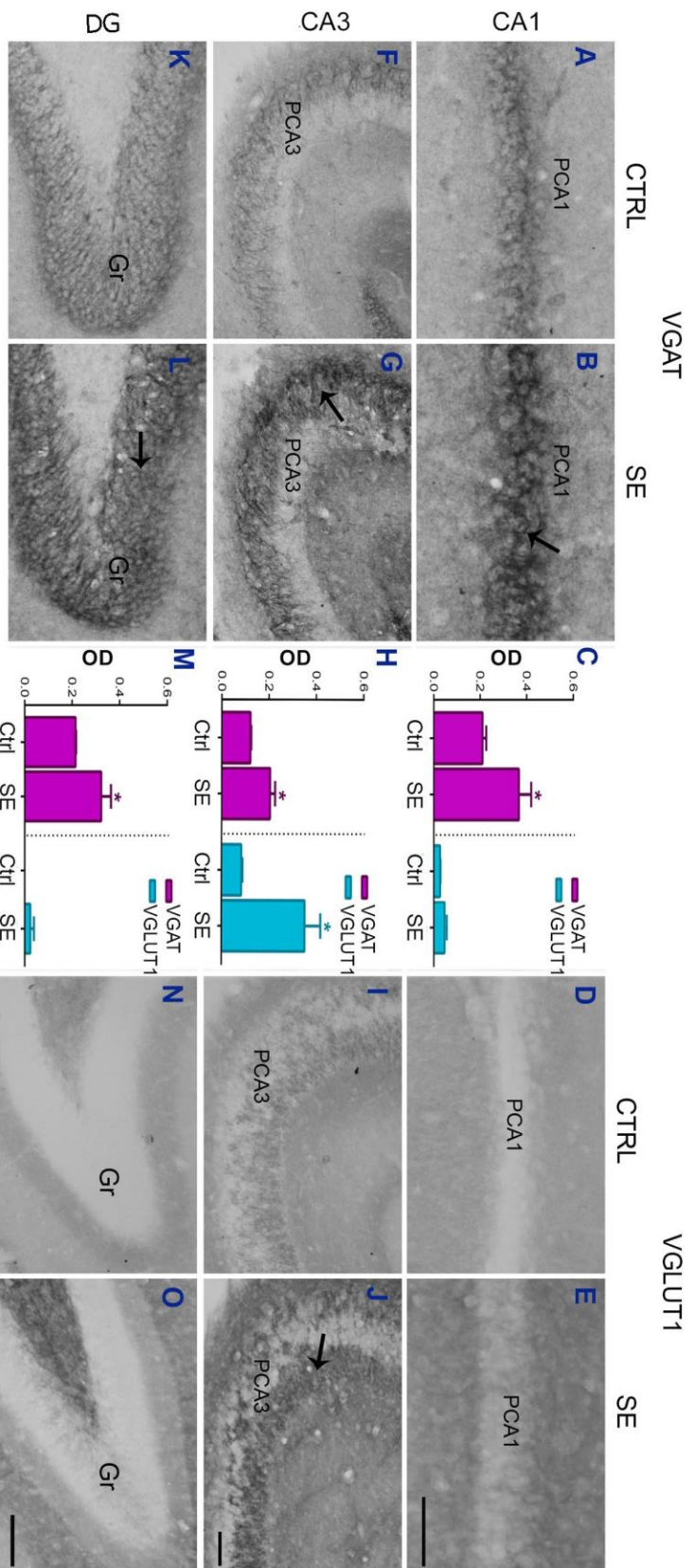


Fig. 7. Increases in VGAT-IR and VGLUT1-IR in the PCA1, PCA3, and Gr layers of the hippocampus in the SE group. Photomicrographs illustrate the VGAT-IR (A, B, F, G, K, L) and VGLUT1-IR (D, E, I, J, N, O) in sagittal sections of the dorsal anterior hippocampus of the Ctrl and SE rats. During SE, important increases in VGAT-IR were observed in the PCA1 (B, arrow), PCA3 (G, arrow), and Gr (L, arrow) layers, whereas VGLUT1-IR showed an increase only in the PCA3 layer (J, arrow). Scale bars: 100 μ m. Bar graphs depict the OD measures obtained for the hippocampal sections of SE and Ctrl groups in the PCA1 (C), PCA3 (H), and Gr (M) layers. Data represent the means \pm SEM of 5 animals per group. * $p < 0.050$, Student's *t*-test.

3.6. *Variations in SV2A levels during late epilepsy*

In the LEPI group (56 days post-SE), there were minor changes in SV2A OD compared with the robust modifications of SE. However, SV2A protein expression generally showed an increase in several layers, reaching significant differences in the LM (Figs. 3C, L, and 4C, dorsal anterior), Mol layer (Figs. 3C green square, 3L and 6A, dorsal anterior and 6C, ventral) and hilus (Figs. 3C white square, 3L and 6I, ventral) compared with Ctrl rats. In addition, the LEPI group showed an increase in SV2A-IR of PCA3 compared with the EEPI group in the 3 regions of the hippocampus (Fig. 5A, B and C). No significant differences in SV2A OD values were observed in the OCA3, Gr, OCA1, RCA1, or RCA3 layers compared with the Ctrl group. It is important to mention the important SV2A variability observed in this group.

3.7. *Modifications of VGAT and VGLUT1-IR after SE*

To determine whether the SV2A modifications occurred after SE had an inhibitory or excitatory origin, an IHC was performed to detect levels of VGAT and VGLUT1 in the hippocampi of rats. Similar expression patterns were observed between VGAT, VGLUT1, and SV2A-IR, i.e., punctate was observed surrounding the somas but was absent in the cell

body of the principal neurons, while in the layers where neuronal dendrites predominate the IR was diffuse (Figs. 2A, 8, and 9). Although VGAT-IR was observed in all layers, the staining pattern preferably involved somatic layers (Fig. 7A, F, and K), while VGLUT1-IR included only dendritic layers (Fig. 7D, I, and N), with the exception PCA3 (Fig. 7J).

In the SE group, a strong and significantly increased VGAT-IR was observed in PCA1 (Fig. 7B and C), PCA3 (Fig. 7G and H), and granular cells (Fig. 7L and M), compared with the IR of the Ctrl group. This effect was similar to the observed in the SV2A-IR after SE. The coexpression SV2A/VGAT-IR is shown in Figs. 8 and 9, notice the strong co-IR of these markers principally in the somatic layers of PCA1 and PCA3 (Figs. 8F and 9F). On the other hand, VGLUT1-IR was substantially increased in PCA3 (Fig. 7H and J), though no changes were observed in the PCA1 and Gr layers. The coexpression of SV2A/VGLUT-IR was present in the mossy fiber terminals in PCA3 (Fig. 9L) according to observed in the IHCs.

3.8. *Modifications of VGAT and VGLUT1-IR during late epilepsy*

To determine whether the increase of SV2A during the LEPI was related to GABAergic or glutamatergic systems, we evaluated VGAT-IR

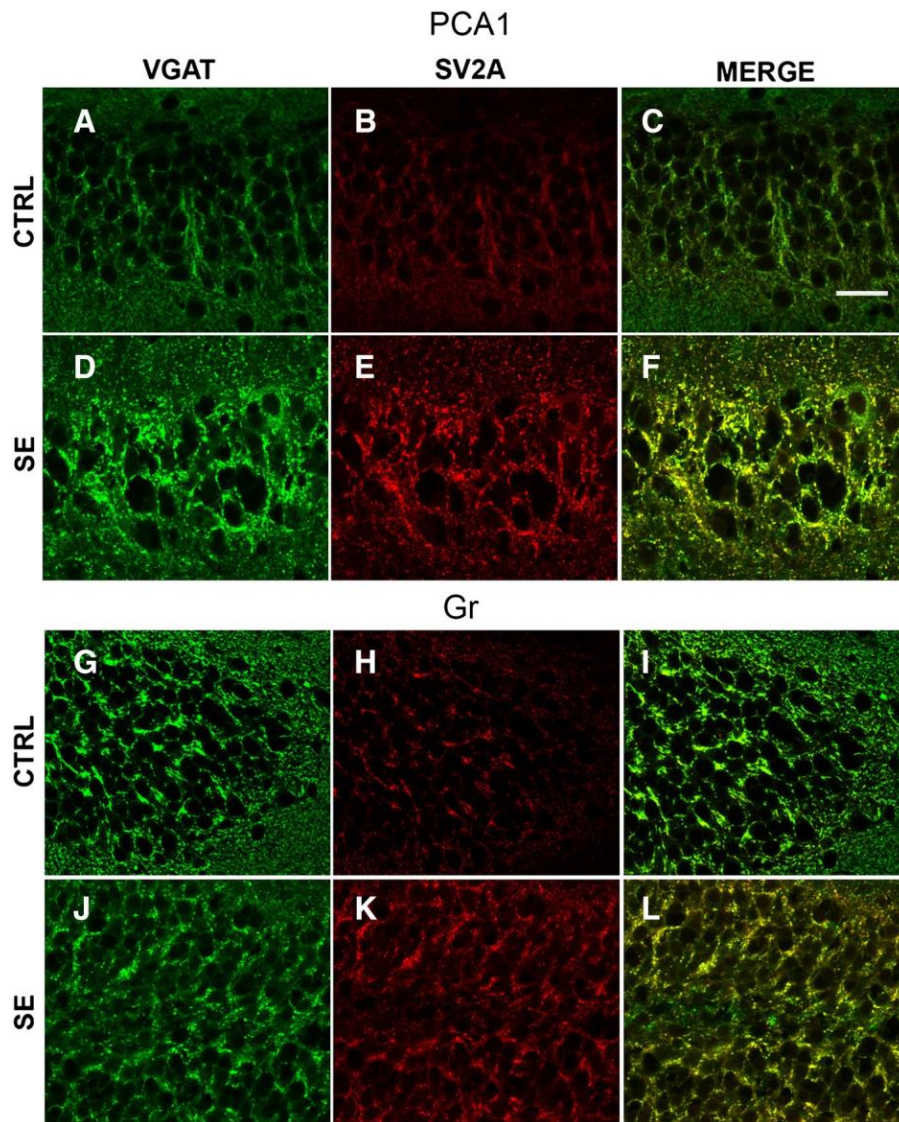


Fig. 8. Analysis of confocal microscopy images of hippocampal sections. During SE, an important coexpression in VGAT/SV2A-IR was observed in PCA1 (F) and Gr (L) layers compared with the control group-IR (C and I). Scale bar: C 30 μ m; also applies to A—L.

and VGLUT1-IR during this stage. Surprisingly, the data did not show differences among evaluated layers compared with the Ctrl group in any markers (Fig. 10). However, there was an evident decrease of VGLUT1 in the inner Mol layer in the LEPI group (Fig. 10D, arrow).

4. Discussion

In this study, one of the most important findings was the substantial increase in SV2A levels during SE, with the greatest region-specific changes observed in the PCA1, PCA3, and Gr layers. Interestingly, these 3 layers are formed by neuronal soma, in contrast to the remaining layers (with a mainly dendritic distribution), which did not present changes in SV2A levels. Continuous limbic seizures involving excessive neuronal activity occur during SE [37]; this condition generates a high demand for neurotransmitter release that could increase the amount of the SV2A protein during this stage. The strong intensity of VGAT-IR in the PCA1, PCA3, and Gr layers suggest that the change in SV2A-IR may have principally occurred in GABAergic interneurons. Therefore, the known glutamatergic disruption generated during SE might augment SV2A expression by increasing the vesicular recycling in

interneurons that are “struggling” to contain the exacerbated excitatory activity. Notably, granular cells are innervated by the chandelier and basket GABAergic interneurons that control the excitatory transmission of the glutamatergic terminals from the perforating pathway [38,39]. Likewise, pyramidal neurons are highly innervated by diverse types of GABAergic interneurons that regulate the transmission of signals from granular mossy fibers to CA3 and Schaffer collaterals to CA1 [38,39]. These interneurons participate in axoaxonic and axosomatic contacts with the main cells located in the layers displaying an increase in SV2A protein levels.

Furthermore, although the SV2A protein is present in both excitatory and inhibitory terminals, recent studies have proposed that SV2A participates mainly in the GABAergic system. In a pentylenetetrazol kindling model, a preferential increase in SV2A levels was observed in the hilar region of the DG, the principal location of many interneurons containing GABA, suggesting that the increase in SV2A is a compensatory mechanism to induce inhibitory neurotransmission [40,41]. Likewise, in a microdialysis study of a genetic model of epilepsy, SV2A mutation preferentially inhibited depolarization-induced GABA but not glutamate release in the hippocampus [42,43]. Finally, hippocampal slices

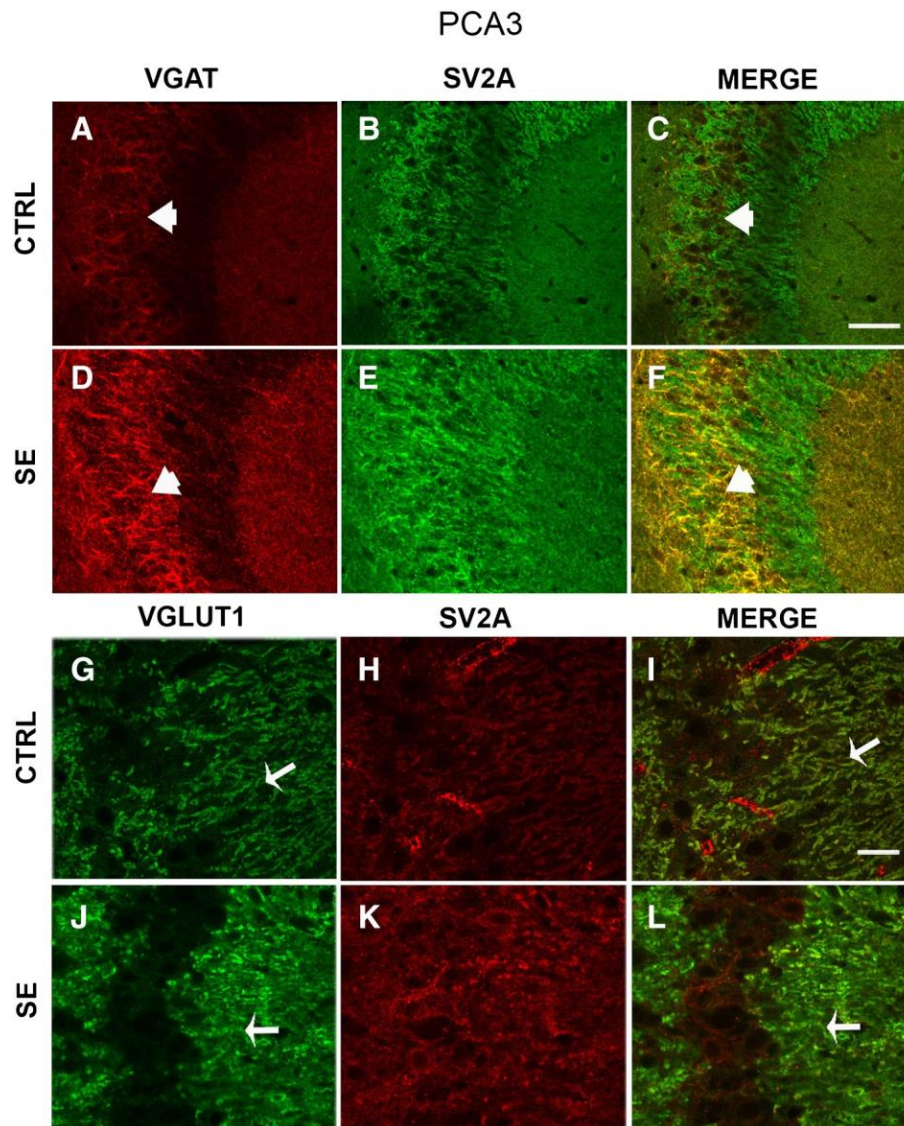


Fig. 9. Analysis of confocal microscopy images of the CA3 layer. Examples from VGAT/SV2A (A—F) and VGLUT1/SV2A (G—L) coexpression during SE are shown. Observe that most VGAT/SV2A staining patterns involve the somatic layer (head arrows), while VGLUT1/SV2A-IR is present in mossy fiber terminals (arrows). Scale bar: C 75 μ m; also applies to A—L.

from SV2A KO mice display an increase in the frequency of spontaneous excitatory postsynaptic currents, whereas both the frequency and amplitude of spontaneous inhibitory postsynaptic currents decrease [13]. This dual effect of SV2A on the GABAergic network suggests that this system is more sensitive to SV2A [12] as is also suggested based on our results.

In SE, we also observed a significant increase in VGLUT1-IR in PCA3. This increase was expected because PCA3 neurons have a triggering burst pattern and multiple synaptic connections [38,39] turn on in a highly excitable region involved in the maintenance of seizures during SE. Moreover, previous studies have reported an increase in the number of N-methyl-D-aspartate acid (NMDA) receptors (specifically those containing the NR1 subunit) at the surfaces of granule cells and in the dendrites of pyramidal cells in CA3 and CA1 1 h after SE induction what supports the participation of the excitatory glutamatergic system [44–46].

In the early stage of epilepsy, the increase in SV2A levels observed during SE returned to baseline values or even decreased. This finding may be explained by reduced neuronal activity at this stage as compared with the continued SE activity [25,36]. Although the alterations in SV2A-IR observed during SE were homogenous, during the late phase of epilepsy, the SV2A modifications presented high interindividual variability. This difference may be related to changes observed during epileptogenesis (mossy fiber sprouting, neuron loss, rewiring of synaptic circuits, and ectopic cell proliferation [25]) that are being progressively consolidated. Likewise, the increase of SV2A-IR, observed in the Mol layer during the chronic phase, could be associated with the formation of new excitatory or inhibitory neuronal contacts resulting from pathophysiological changes in the epileptic brain. Although we did not observe increases in VGAT or VGLUT1, we cannot discard the possibility that the augmentation of SV2A is related to other different markers, mainly VGLUT markers (i.e.,

VGLUT2 or VGLUT3) since, in epileptic human tissue, changes in the levels of this family of proteins have been reported [47]. In addition, previous studies have shown that the neuronal activity of entorhinal cortex cells increases during epilepsy [48]. This region directly innervates the middle and outer Mol layers of the DG. Thus, the augmentation of the excitatory activity of these

terminals may explain the increased expression of SV2A associated with other markers.

Notably, our results differ from those reported by van Vliet et al. [19] and Hanaya et al. [49], potentially because of the differences in the animal model used to induce epilepsy and the quantification techniques employed. Another important issue is that van Vliet et al. [19] showed a SV2A-IR decrease in a chronic epilepsy model, 6–8 months post-SE, where the frequency of seizures could generate higher excitotoxicity and neuronal loss. It is well-known that in post-SE models, unpredictable neuronal death can occur in the hippocampal and parahippocampal areas [50,51], which could negatively affect SV2A protein expression as the disease progresses. Moreover, patients with refractory epilepsy that presented this neurological disorder for long periods of time and lack adequate control of their seizures also showed decreases in SV2A-IR [19,20,52,53]. Thus, our results could be useful for understanding the SV2A protein expression variations at the beginning, but not in the advanced, stages of the disease.

Finally, it is important to emphasize that the results presented above have clinical relevance since recent studies posit that the SV2A protein may be a master regulator in different disease processes, including epilepsy [54]. This regulator might be modulated by neuronal activity (as shown in SE) and disease severity. Furthermore, SV2A is the primary molecular target of the antiseizure and antiepileptogenic drug LEV [15], and it has been proposed that the expression of this protein is closely related to the response to treatment [55]. The important SV2A variability observed in LEPI animals might generate different interindividual characteristics that could be responsible for inconsistent responses to treatment with LEV in animals and humans. Further studies are necessary to address this challenge of contemporary epilepsy research.

5. Conclusions

The present study showed selective changes in SV2A levels after SE and during late epilepsy in the hippocampus of lithium-pilocarpine rats. After SE, SV2A increased in a region-specific manner in the somatic

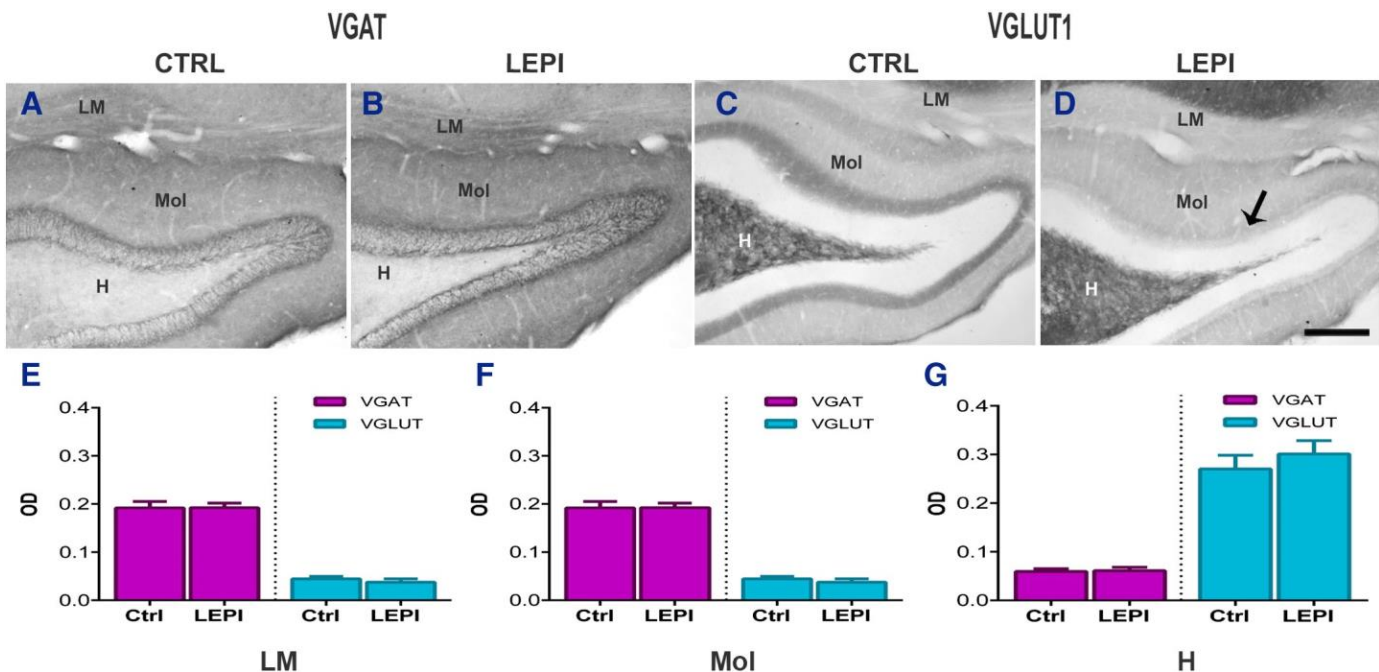


Fig. 10. Photomicrographs illustrate VGAT and VGLUT1-IR in the LM, Mol, and hilus layers in sagittal sections of the dorsal anterior hippocampus of the Ctrl (A and C) and LEPI (B and D) rats. No differences were found in evaluated regions. Scale bar: 100 μ m. Bar graphs depict the values of relative OD obtained for the hippocampal sections of LEPI and Ctrl groups. Data represent the means \pm SEM. Ctrl n = 4; LEPI n = 5.

layers. The strong intensity of VGAT in these layers involved mostly GABAergic interneurons, supporting the hypothesis that SV2A modifications in SE preferentially depend on the GABAergic system, without dismissing the idea that, in PCA3, the glutamatergic system is also involved because of the high excitability generated during the SE. During late epilepsy, SV2A increased in LM, Mol, and hilar layers; however, we did not find a clear glutamatergic or GABAergic origin that could be modulating the augmentation of SV2A. Our results suggest that the SV2A modifications may depend on several factors, such as neuronal activity or the pathophysiology of the nervous tissue, and they might appear in both excitatory and inhibitory systems, depending on the epilepsy stage.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest, financial or otherwise.

Acknowledgments

We are grateful to María Sara Navarrete Hernández, Mercedes Edna García Cruz, Gilberto Cárdenas Marcial, Monserrat López Guerrero, and Natalia Hernández Carrera for providing administrative and technical assistance. The present publication was supported by grants from the CONACyT (SALUD-2012-01-180069) and INP (111/2012). I.J.C.G. and L.A.P.M. are recipients of fellowships from CONACyT.

References

- [1] Bajjalieh SM, Peterson K, Linial M, Scheller RH. Brain contains two forms of synaptic vesicle protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(6):2150–4.
- [2] Bajjalieh SM, Peterson K, Shinghal R, Scheller RH. SV2, a brain synaptic vesicle protein homologous to bacterial transporters. *Science* 1992;257(5074):1271–3.
- [3] Feany MB, Lee S, Edwards RH, Buckley KM. The synaptic vesicle protein SV2 is a novel type of transmembrane transporter. *Cell* 1992;70(5):861–7.
- [4] Janz R, Südhof TC. SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neuroscience* 1999;94(4): 1279–90.
- [5] Buckley K, Kelly RB. Identification of a transmembrane glycoprotein specific for secretory vesicles of neural and endocrine cells. *J Cell Biol* 1985;100(4): 1284–94.
- [6] Grønborg M, Pavlos NJ, Brunk I, Chua JJ, Münster-Wandowski A, Riedel D, et al. Quantitative comparison of glutamatergic and GABAergic synaptic vesicles unveils selectivity for few proteins including MAL2, a novel synaptic vesicle protein. *J Neurosci* 2010;30(1):2–12. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4074-09.2010>.
- [7] Custer KL, Austin NS, Sullivan JM, Bajjalieh SM. Synaptic vesicle protein 2 enhances release probability at quiescent synapses. *J Neurosci* 2006;26(4):1303–13.
- [8] Yao J, Nowack A, Kensel-Hammes P, Gardner RG, Bajjalieh SM. Cotrafficking of SV2 and synaptotagmin at the synapse. *J Neurosci* 2010;30(16):5569–78. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4781-09.2010>.
- [9] Janz R, Goda Y, Geppert M, Missler M, Südhof TC. SV2A and SV2B function as redundant CA2+ regulators in neurotransmitter release. *Neuron* 1999;24(4):1003–16.
- [10] Xu T, Bajjalieh SM. SV2 modulates the size of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Nat Cell Biol* 2001;3(8):691–8.
- [11] Crowder KM, Gunther JM, Jones TA, Hale BD, Zhang HZ, Peterson MR, et al. Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A). *Proc Natl Acad Sci U S A*

1999;96(26):15268—73.

- [12] Bartholome O, Van den Ackerveken P, Sánchez Gil J, de la Brassinne Bonardeaux O, Leprince P, Franzen R, et al. Puzzling out synaptic vesicle 2 family members functions. *Front Mol Neurosci* 2017;10:148.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00148>. eCollection2017.
- [13] Venkatesan K, Alix P, Marquet A, Doupagne M, Niespodziany I, Rogister B, et al. Altered balance between excitatory and inhibitory inputs onto CA1 pyramidal neurons from SV2A-deficient but not SV2B-deficient mice. *J Neurosci Res* 2012;90(12): 2317—27.
<https://doi.org/10.1002/jnr.23111>.
- [14] Noyer M, Gillard M, Matagne A, Hénichart JP, Wülfert E. The novel antiepileptic drug levetiracetam (ucb L059) appears to act via a specific binding site in CNS membranes. *Eur J Pharmacol* 1995;286(2):137—46.
- [15] Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh SM, Matagne A, et al. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(26):9861—6.
- [16] Gillard M, Fuks B, Leclercq K, Matagne A. Binding characteristics of brivaracetam, a selective, high affinity SV2A ligand in rat, mouse and human brain: relationship to anti-convulsant properties. *Eur J Pharmacol* 2011;664(1—3):36—44.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.04.064>.

- Gillard M, Chatelain P, Fuks B. Binding characteristics of levetiracetam to synaptic vesicle protein 2A (SV2A) in human brain and in CHO cells expressing the human recombinant protein. *Eur J Pharmacol* 2006;536(1–2):102–8.
- [17] Kaminski RM, Gillard M, Leclercq K, Hanon E, Lorent G, Dassesse D, et al. Proepileptic phenotype of SV2A-deficient mice is associated with reduced anticonvulsant efficacy of levetiracetam. *Epilepsia* 2009;50(7):1729–40. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02089.x>.
- [18] van Vliet EA, Aronica E, Redeker S, Boer K, Gorter JA. Decreased expression of synaptic vesicle protein 2A, the binding site for levetiracetam, during epileptogenesis and chronic epilepsy. *Epilepsia* 2009;50(3):422–33. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01727.x>.
- [19] Crèvecoeur J, Kaminski RM, Rogister B, Eoerch P, Vandenplas C, Neveux M, et al. Expression pattern of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms in patients with temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014;40 (2):191–204. <https://doi.org/10.1111/nan.12054>.
- [20] Gorter JA, Iyer A, White I, Colzi A, van Vliet EA, Sisodiya S, et al. Hippocampal subregion-specific microRNA expression during epileptogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 2014;62:508–20. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.10.026>.
- [21] Finnema SJ, Nabulsi NB, Eid T, Detyniecki K, Lin SF, Chen MK, et al. Imaging synaptic density in the living human brain. *Sci Transl Med* 2016;8(348):348ra96. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6667>.
- [22] Finnema SJ, Nabulsi NB, Mercier J, Lin SF, Chen MK, Matuskey D, et al. Kinetic evaluation and test–retest reproducibility of [¹¹C]UCB-J, a novel radioligand for positron emission tomography imaging of synaptic vesicle glycoprotein 2A in humans. *J Cereb Blood Flow Metab* 2017;1. <https://doi.org/10.1177/0271678X17724947>.
- [23] Santana-Gómez CE, Orozco-Suárez SA, Talevi A, Bruno-Blanch L, Magdaleno-Madrigal VM, Fernández-Mas R, et al. Propylparaben applied after pilocarpine-induced status epilepticus modifies hippocampal excitability and glutamate release in rats. *Neurotoxicology* 2017;59:110–20. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.01.009>.
- [24] Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* 2008;172(2):143–57. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.04.019>.
- [25] Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 1987;23(3):953–68.
- [26] Glien M, Brandt C, Potschka H, Löscher W. Effects of the novel antiepileptic drug levetiracetam on spontaneous recurrent seizures in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2002;43(4):350–7.
- [27] Glien M, Brandt C, Potschka H, Voigt H, Ebert U, Löscher W. Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy. *Epilepsy Res* 2001;46(2):111–9.
- [28] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972;32(3):281–94.
- [29] Arida RM, Scorza FA, Peres CA, Cavalheiro EA. The course of untreated

seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res* 1999;34(2—3):99—107.

- [30] Pichardo-Macías LA, Contreras-García IJ, Zamudio SR, Mixcoha E, Mendoza-Torreblanca JG. Synaptic vesicle protein 2A as a novel pharmacological target with broad potential for new antiepileptic drugs. In: Talevi A, Rocha L, editors. *Antiepileptic drug discovery: novel approaches*. New York: Springer; 2016. p. 53—81.
- [31] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th ed. London: Elsevier; 2007.
- [32] Moser MB, Moser EI. Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *J Neurosci* 1998;18(18):7535—42.
- [33] Moser MB, Moser EI. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 1998;8(6):608—19.
- [34] Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach HA, Murison R, Moser EI, Moser MB. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(16):10825—30.
- [35] Scorza FA, Arida RM, Naffah-Mazzacoratti Mda G, Scerni DA, Calderazzo L, Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *An Acad Bras Cienc* 2009;81(3):345—65.
- [36] Reddy DS, Kuruba R. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *Int J Mol Sci* 2013;14(9):18284—318. <https://doi.org/10.3390/ijms140918284>.
- [37] Amaral D, Lavenex P. Hippocampal neuroanatomy. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editors. *The hippocampus book*. New York: Oxford University Press, Inc.; 2007. p. 37—114.
- [38] Spruston N, McBain C. Structural and functional properties of hippocampal neurons. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editors. *The hippocampus book*. New York: Oxford University Press, Inc.; 2007. p. 133—201.
- [39] Ohno Y, Ishihara S, Terada R, Kikuta M, Sofue N, Kawai Y, et al. Preferential increase in the hippocampal synaptic vesicle protein 2A (SV2A) by pentylentetrazole kindling. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;390(3):415—20. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.035>.
- [40] Ohno Y, Tokudome K. Therapeutic role of synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) in modulating epileptogenesis. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2017;16(4):463—71. <https://doi.org/10.2174/1871527316666170404115027>.
- [41] Tokudome K, Okumura T, Terada R, Shimizu S, Kunisawa N, Mashimo T, et al. A missense mutation of the gene encoding synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) confers seizure susceptibility by disrupting amygdalar synaptic GABA release. *Front Pharmacol* 2016;7:210. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00210>.
- [42] Tokudome K, Okumura T, Shimizu S, Mashimo T, Takizawa A, Serikawa T, et al. Synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) regulates kindling epileptogenesis via GABAergic neurotransmission. *Sci Rep* 2016;6:27420. <https://doi.org/10.1038/srep27420>.

- [43] Wasterlain CG, Naylor DE, Liu H, Niquet J, Baldwin R. Trafficking of NMDA receptors during status epilepticus: therapeutic implications. *Epilepsia* 2013;54(Suppl. 6): 78—80. <https://doi.org/10.1111/epi.12285>.
- [44] Naylor DE, Liu H, Niquet J, Wasterlain CG. Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus. *Neurobiol Dis* 2013;54:225—38. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.12.015>.
- [45] Postnikova TY, Zubareva OE, Kovalenko AA, Kim KK, Magazanik LG, Zaitsev AV. Status epilepticus impairs synaptic plasticity in rat hippocampus and is followed by changes in expression of NMDA receptors. *Biochemistry (Mosc)* 2017;82(3): 282—90. <https://doi.org/10.1134/S0006297917030063>.
- [46] Van Liefferinge J, Jensen CJ, Albertini G, Bentea E, Demuyser T, Merckx E, et al. Altered vesicular glutamate transporter expression in human temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Neurosci Lett* 2015;590:184—8. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.080>.
- [47] Lévesque M, Behr C, Avoli M. The anti-ictogenic effects of levetiracetam are mirrored by interictal spiking and high-frequency oscillation changes in a model of temporal lobe epilepsy. *Seizure* 2015;25:18—25. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2014.11.008>.
- [48] Hanaya R, Hosoyama H, Sugata S, Tokudome M, Hirano H, Tokimura H, et al. Low distribution of synaptic vesicle protein 2A and synaptotagmin-1 in the cerebral cortex and hippocampus of spontaneously epileptic rats exhibiting both tonic convulsion and absence seizure. *Neuroscience* 2012;221:12—20. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.06.058>.
- [49] Motte J, Fernandes MJ, Baram TZ, Nehlig A. Spatial and temporal evolution of neuronal activation, stress and injury in lithium-pilocarpine seizures in adult rats. *Brain Res* 1998;793(1—2):61—72.
- [50] Lopim GM, Vannucci Campos D, Gomes Da Silva S, de Almeida AA, Lent R, Cavalheiro EA, et al. Relationship between seizure frequency and number of neuronal and non-neuronal cells in the hippocampus throughout the life of rats with epilepsy. *Brain Res* 2016;1634:179—86. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.12.055>.
- [51] Toering ST, Boer K, de Groot M, Troost D, Heimans JJ, Spliet WG, et al. Expression patterns of synaptic vesicle protein 2A in focal cortical dysplasia and TSC-cortical tubers. *Epilepsia* 2009;50(6):1409—18. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01955.x>.
- [52] Feng G, Xiao F, Lu Y, Huang Z, Yuan J, Xiao Z, et al. Down-regulation synaptic vesicle protein 2A in the anterior temporal neocortex of patients with intractable epilepsy. *J Mol Neurosci* 2009;39(3):354—9. <https://doi.org/10.1007/s12031-009-9288-2>.
- [53] Löscher W, Gillard M, Sands ZA, Kaminski RM, Klitgaard H. Synaptic vesicle glycoprotein 2A ligands in the treatment of epilepsy and beyond. *CNS Drugs* 2016;30 (11):1055—77.
- [54] de Groot M, Aronica E, Heimans JJ, Reijneveld JC. Synaptic vesicle

protein 2A predicts response to levetiracetam in patients with glioma.
Neurology 2011;77(6):532–9.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318228c110>.

- [55] Gillard M, Chatelain P, Fuks B. Binding characteristics of levetiracetam to synaptic vesicle protein 2A (SV2A) in human brain and in CHO cells expressing the human recombinant protein. *Eur J Pharmacol* 2006;536(1–2):102–8.

ANEXO 2

En el presente trabajo hemos demostrado que los niveles de proteína SV2A son cruciales para la respuesta favorable al fármaco anticonvulsivo levetiracetam, sin embargo, podría haber otros mecanismos involucrados en esta respuesta, por ej. la actividad sináptica poblacional. De manera previa se ha postulado que el mecanismo de acción del levetiracetam podría ser a través del reciclado vesicular, ingresando a la vesícula sináptica durante la endocitosis, uniéndose a su blanco molecular y finalmente siendo liberado durante la exocitosis, por tanto, terminales sinápticas más activas permitirían un mayor efecto del levetiracetam. Para tratar de dilucidar esta hipótesis nos planteamos un objetivo adicional:

Correlacionar la amplitud de la espiga poblacional de potenciales provocados encontrados en el giro dentado y CA3 de ratas epilépticas con el efecto de la administración aguda con levetiracetam.

Grupos experimentales

- Grupo control + solución salina (n=6). Grupo control al cual se le aplicó una dosis aguda de solución salina el día 56 post SE. Registros provocados antes y después de la administración del fármaco.
- Grupo control + Levetiracetam (n=6). Grupo control al cual se le aplicó una dosis aguda de levetiracetam el día 56 post SE. Registros provocados antes y después de la administración del fármaco.
- Grupo epiléptico + solución salina (n=6). Grupo epiléptico al cual se le aplicó una dosis aguda de solución salina el día 56 post SE. Registros provocados antes y después de la administración del fármaco.
- Grupo epiléptico + Levetiracetam (n=6). Grupo epiléptico al cual se le aplicó una dosis aguda de levetiracetam el día 56 post SE. Registros provocados antes y después de la administración del fármaco.

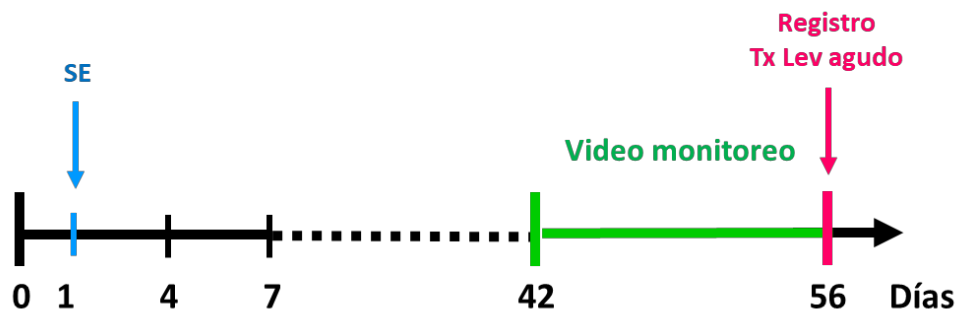


Figura 33. Diseño experimental. El día 1 se administró litio-pilocarpina a ratas machos Wistar para inducir el *status epilepticus* (SE; flecha azul). Para evaluar la respuesta al tratamiento con levetiracetam, los animales fueron video-monitoreados durante dos semanas antes del registro electrofisiológico. El día 56 post SE se realizó el registro electrofisiológico, antes y después de una inyección aguda con levetiracetam (300 mg/kg). Posteriormente los animales fueron sometidos a eutanasia.

Equipo electrofisiológico

Se utilizó un electrodo de estimulación (bipolar concéntrico de acero inoxidable recubierto con teflón y de 25 mm de diámetro) y un electrodo de registro (monopolar de acero inoxidable recubierto con teflón y de 37 mm de diámetro). La respuesta electrofisiológica fue adquirida a través del módulo MCE 100C (Biopac Systems), amplificada con el módulo MP150 (Biopac Systems), digitalizada y promediada usando el software Acknowledge 4.2. La ganancia fue de 200. La tasa de muestreo fue de 10 000 muestras por segundo. Cinco puntos fueron seleccionados sobre cada promedio de la curva para estimar la pendiente del potencial post sináptico excitador y la amplitud de la espiga poblacional. Se utilizó una unidad de aislamiento de estímulos fotoeléctricos (PSIU) modelo 6

Procedimiento quirúrgico. Cirugía estereotáxica

Los registros electrofisiológicos se realizaron en el día 56 post SE y debido a que cada registro tenía una duración de 8 horas sólo se pudo evaluar un animal por día. Los grupos epilépticos y controles fueron registrados de manera alternada. Los animales se anestesiaron con uretano (1.5 mg/kg, i.p., Sigma) y 40 minutos después se montaron en un equipo estereotáxico; la postura correcta se evaluó a través del reflejo ocular al introducir los lápices metálicos en el canal auditivo (Figura 34). Se realizó una incisión en la piel del cráneo siguiendo el eje antero-posterior, esto para descubrir el cráneo y ubicar las coordenadas en donde se colocarían los electrodos. Se retiró el tejido conectivo que cubría el cráneo y con H₂O₂ se expusieron las suturas craneales que dan origen a dos puntos de intersección: Bregma y Lambda (Figura 34). Para cerciorarse de que el animal presente la misma inclinación en todos los puntos de la cabeza, se midió la coordenada dorso-ventral en Bregma y Lambda, ajustando el estereotáxico hasta obtener los mismos valores para ambos puntos. En seguida se tomó el valor de Bregma con ambos electrodos (estimulación y registro) y se realizó el cálculo correspondiente para llegar a la coordenada a analizar.

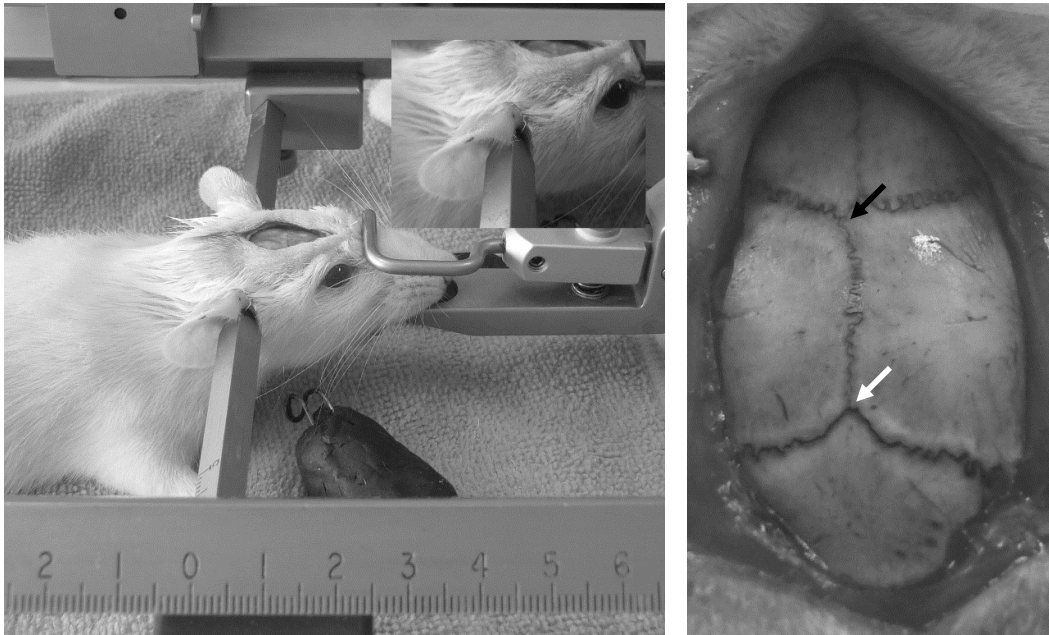


Figura 34. Colocación de la rata en el equipo estereotáxico y ubicación de los puntos anatómicos Bregma y Lambda. A. Para la correcta colocación de la rata en el eje latero-medial, los lápices del equipo estereotáxico se colocan en el orificio auditivo de la rata, quedando ambos lápices centrados y ajustados (al subir o bajar la cabeza de la rata debe mantenerse en esa posición). Con respecto a la correcta posición dorso – ventral, se midió la profundidad al tocar el electrodo en Bregma y luego en lambda, obteniendo valores iguales para ambos puntos. B. El punto anatómico Bregma se forma por la intersección de la sutura coronal con la sutura sagital (flecha negra), mientras que Lambda se forma por la intersección de la sutura sagital y la sutura lambdaoidea (flecha blanca).

Para la obtención del registro electrofisiológico del giro dentado se implantó el electrodo de estimulación en el haz angular de la vía perforante (AP +7.2; LM +4.1; DV -2) y el electrodo de registro en el hilus del DG ipsilateral (AP -3.5; LM -2.1; DV -3.5). Mientras que para la región CA3 se colocó el electrodo de estimulación en la vía comisural (AP +1.7; LM +1; DV -3.3) y el de registro en la región de CA3 ipsilateral (AP -3.4; LM -3.2; DV -3.3). A pesar de que las coordenadas ventrales se calcularon de manera teórica, las coordenadas finales se obtuvieron durante el monitoreo del registro electrofisiológico de la respuesta provocada en la zona evaluada seguido del pulso de estimulación.

Se mantuvo la temperatura rectal a 37°C durante todo el registro electrofisiológico.

Registros electrofisiológico



Figura 35. Diseño experimental de los protocolos utilizados en el registro electrofisiológico.

El día 56 post SE se llevó a cabo el registro electrofisiológico. Después de la obtención de la señal característica para cada región se corrió el protocolo de estabilización (2 horas), posteriormente la curva estímulo-respuesta (curva I/O, 33 minutos), al término de éste protocolo se pasó el protocolo de pulsos pareados (48 minutos) y finalmente registro basal (15 minutos). Se administró una inyección aguda de levetiracetam (300 mg/kg; i.p.) y 60 minutos después se obtuvo el registro basal, de manera subsiguiente el protocolo de curva estímulo-respuesta y se concluyó con el protocolo de pulsos pareados.

Estabilización

Una vez obtenida la morfología de la respuesta para cada región se permitió un periodo de estabilización de la señal. Este protocolo consistió en liberar pulsos monofásicos con duración de 0.1 ms y amplitud de 1500 μ A cada 15 minutos (intervalo inter-serie) durante un tiempo total de 2 horas. Con la intención de tener réplicas de cada tiempo de estimulación, se aplicaron 5 pulsos por cada tiempo de estimulación, con un intervalo inter pulso de 5 s (Figura 36).



Figura 36. Protocolo de estabilización. Se dieron 9 series conformados por 5 estímulos cada uno. El intervalo entre cada pulso fue de 5 segundos y el tiempo transcurrido entre cada tren fue de 15 minutos.

Curva estímulo/respuesta

El registro para la obtención de la curva I/O consistió en la liberación de pulsos monofásicos con duración de 0.1 ms y 16 series con intensidad ascendente. Cada serie estuvo conformado por 5 pulsos de la misma intensidad; las intensidades correspondieron a 50,

100, 200, 300...1500 μA . El intervalo inter pulso fue de 10 s y el intervalo inter series fue de 120 s (Figura 37).

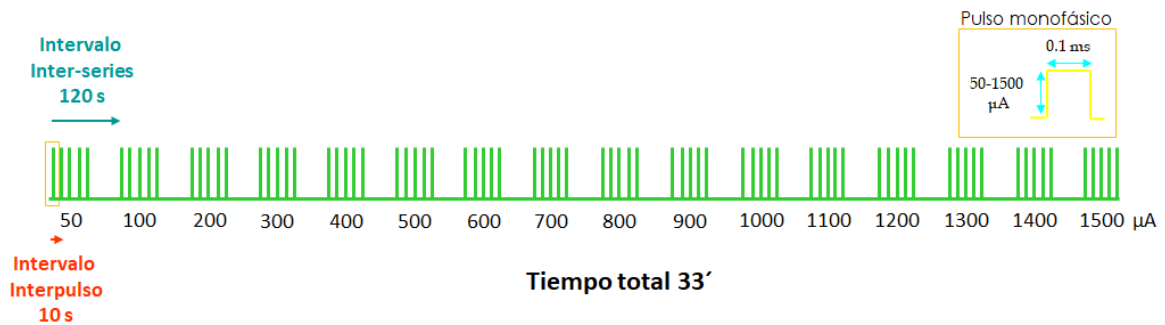


Figura 37. Protocolo curva estímulo-respuesta. Se dieron 16 series conformados por 5 estímulos cada uno; cada tren desplegó una intensidad creciente, comenzando con 50 μA , posteriormente 100 μA y aumentando 100 μA en cada tren hasta alcanzar los 1500 μA . El intervalo entre cada pulso fue de 10 segundos y el tiempo transcurrido entre cada serie fue de 120 segundos.

Pulsos pareados. Depresión y facilitación

Para evaluar la depresión y facilitación en cada región se liberaron 5 series con 10 pares de pulsos cuadrados monofásicos por cada respuesta (con una intensidad que produjo el 20, 50 y 100 % de la respuesta máxima). Cada pulso tuvo una duración de 0.1 ms.

Para el giro dentado el intervalo inter par fue de 10 s, mientras que el intervalo inter pulso fue de 10, 20, 30, 70 y 250 ms para cada serie (Figura 38).

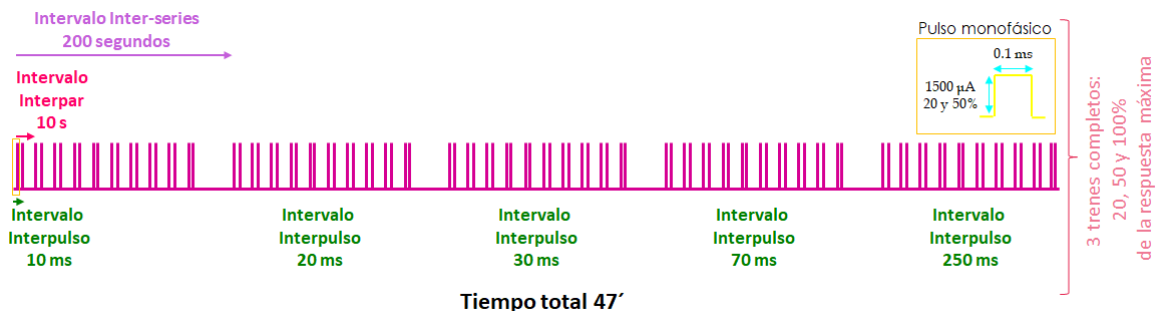


Figura 38. Protocolo pulsos pareados. Se dieron 10 pares de estímulos cada uno. Cada serie presentó diferente tiempo entre pares de pulso. El primer tren tuvo intervalos inter pulso de 10 ms, el segundo de 20 ms, el tercero de 30 ms, el cuarto de 70 ms y el quinto de 250 ms. El intervalo inter par fue de 10 s y el intervalo entre cada tren fue de 200 s. Los 5 trenes se corrieron para el 20 %, 50 % y 100 % de la respuesta máxima obtenida en la curva I/O con una intensidad de 1500 μA . La duración de los 5 trenes fue de 15 min y el tiempo total de 47 min.

Para la región de CA3 el intervalo inter par fue de 10 s y los intervalos inter pulsos fueron de 10, 30, 50, 100 y 800 ms para cada tren (Figura 39).

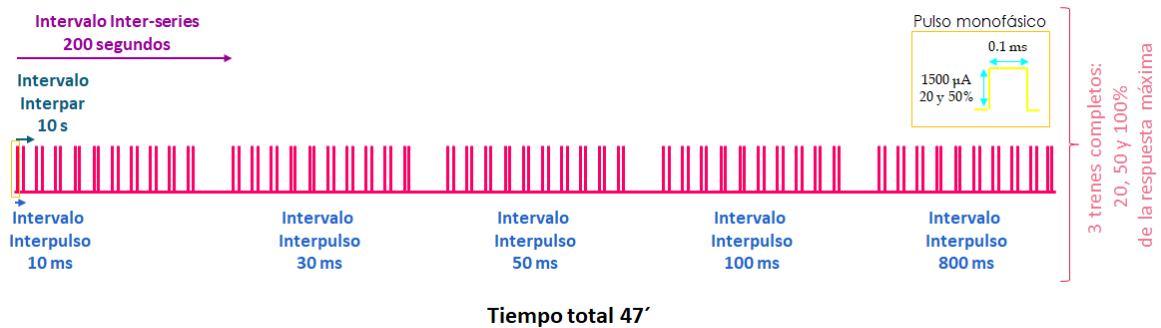


Figura 39. Protocolo pulsos pareados. Se dieron 10 series de estímulos cada uno. Cada tren presentó diferente tiempo entre pares de pulso. El primer tren tuvo intervalos inter pulso de 10 ms, el segundo de 30 ms, el tercero de 50 ms, el cuarto de 100 ms y el quinto de 800 ms. El intervalo inter par fue de 10 s y el intervalo entre cada tren fue de 200 s. Los 5 trenes se corrieron para el 20 %, 50 % y 100 % de la respuesta máxima obtenida en la curva I/O con una intensidad de 1500 μA . La duración de los 5 trenes fue de 15 min y el tiempo total de 47 min.

Parámetros a evaluar en cada protocolo

La pendiente de la fase ascendente del potencial postsináptico excitador (PPSE) se determinó en un intervalo fijo, se dividió en 3 tercios y el tercio de en medio fue el que se tomó en cuenta. La amplitud de la espiga poblacional se calculó a través de la diferencia de voltaje entre el punto más negativo de la punta y una línea que conecta el comienzo de la espiga con el pico positivo del potencial postsináptico.

RESULTADOS

Resultados preliminares de 3 animales epilépticos evaluados antes y después de la administración aguda con levetiracetam. En la figura 40 se observa que no hay cambios significativos en la amplitud de la espiga poblacional, ni en la pendiente del potencial post sináptico excitador, antes y una hora después de la administración aguda del levetiracetam en ratas epilépticas. A pesar de que no se observan cambios en la pendiente del potencial postsináptico excitador.

De manera previa se ha reportado en el giro dentado una disminución en la amplitud de la espiga poblacional después de la administración aguda del levetiracetam, nuestros datos no muestran diferencias, esto podría deberse a las dificultades técnicas que tuvimos durante los registros electrofisiológicos y al número de animales evaluados ($n=3$) ya que hay una gran variabilidad inter individual.

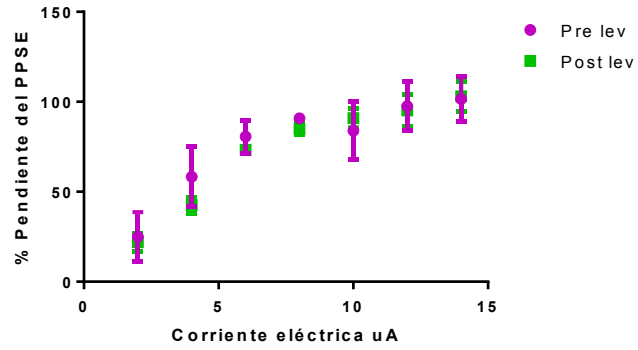
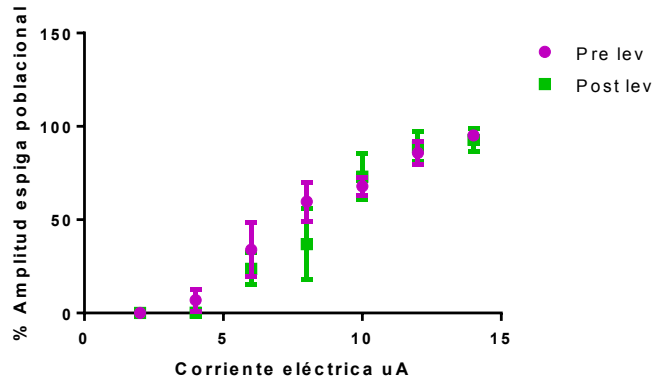


Figura 40. El levetiracetam no modifica la transmisión sináptica en el giro dentado. Se muestra la curva estímulo-respuesta de animales epilépticos registrados antes y una hora después de la administración del levetiracetam. Se evaluó el porcentaje de cambio de la pendiente del potencial post sináptico excitador y la amplitud de la espiga poblacional al aplicar estímulos monofásicos con estímulos de intensidad crecientes. Los datos representan la media + SEM