



Citación: Yauri Huamán, Y., Cáceres Robles, R. J., & Becerra Flores, C. T. (2025). Efectos de Crisis Convulsivas Inducidas por Kindling con Pentilentetrazol a Largo Plazo sobre Neuroinflamación: Análisis Immunohistoquímico y EEG en Ratas. Q'EUÑA, 16(1), 13-25.

<https://doi.org/10.51343/rq.v16i1.1789>

Recibido: 07-04-2025

Aceptado: 20-05-2025

Publicado: 27-06-2025



Copyright: © 2025. Este es un artículo de acceso abierto revisado por pares y publicado por la Revista Q'EUÑA de la Sociedad Botánica del Cusco y la UNSAAC (<http://revistas.unsaac.edu.pe/index.php/RQ>) y distribuido bajo los términos de la licencia de atribución [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), que permite el uso, distribución y reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre que se acredite el autor y la fuente originales.

Declaración de disponibilidad de datos: Todos los datos relevantes están dentro del documento y sus archivos de información de respaldo.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Autor Corresponsal:

Yessenia Yauri Huamán
yessenia.yauri@unmsm.edu.pe

Efectos de Crisis Convulsivas Inducidas por Kindling con Pentilentetrazol a Largo Plazo sobre Neuroinflamación: Análisis Immunohistoquímico y EEG en Ratas

Long-Term Effects of Pentylenetetrazol-Induced Kindling Seizures on Neuroinflammation: Immunohistochemical and EEG Analysis in Rats

Yessenia Yauri Huamán^{1,3}, Rodrigo Jhampier Cáceres Robles^{2,3}, Christell Tatiana Becerra Flores³

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

²Facultad de Psicología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

³Instituto Científico, Laboratorio de Investigación en Neurociencias, Cusco, Perú.

Resumen

El presente estudio experimental describe los efectos del kindling inducido por PTZ, un modelo animal validado y ampliamente utilizado para estudiar la epileptogénesis mediante la inducción progresiva de convulsiones. La investigación se centra en el análisis descriptivo de la fase post-kindling, tanto a nivel de la actividad cerebral como molecular. Para este fin 12 ratas fueron sometidas a un protocolo de tres etapas: habituación, challenge (60 mg/kg) y kindling que consta de la administración repetida de PTZ a dosis subconvulsivantes (35 mg/kg), y el grupo control conformado por 6 ratas, que solo fue expuesto a inyecciones de solución salina. En el primer mes de la fase post-kindling se implantaron electrodos epidurales a un subconjunto de los sujetos para evaluar los registros de electroencefalograma (EEG). Al segundo mes de la fase post-kindling otros sujetos fueron destinados para el análisis molecular mediante la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia (IF) con los anticuerpos GFAP y NeuN como marcadores de astrocitos y neuronas maduras respectivamente. Estos análisis se repitieron en el tercer mes posterior al kindling. Los resultados obtenidos mediante EEG evidenciaron eventos interictales en ratas durante el primer mes de la fase post-kindling. Al segundo y tercer mes, se observó un incremento notable del marcador GFAP para astrocitos, sin cambios notables en la expresión de NeuN para estructuras del hipocampo (CA1, CA3 y Giro Dentado). Estos resultados contribuyen a la caracterización de la fase post-kindling, favoreciendo una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes del modelo PTZ y de su evolución temporal.

Palabras clave: Pentilentetrazol, Kindling crónico, GFAP, NeuN, Hipocampo

Abstract

The present experimental study examines the effects of PTZ-induced kindling, a well-established and widely used animal model for studying epileptogenesis through the progressive induction of seizures. The novelty of this research lies in its descriptive analysis of the post-kindling phase, focusing on both brain activity and molecular changes. Twelve rats were subjected to a three-phase protocol: habituation, challenge (60 mg/kg), and kindling, which involved repeated administration of subconvulsive doses of PTZ (35 mg/kg). The control group received only saline injections. In the first month following kindling, a subset of animals was implanted with epidural electrodes to record brain activity through electroencephalograph (EEG). In the second month, another subset was used for molecular analyses using immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF), with GFAP and NeuN serving as markers for astrocytes and mature neurons, respectively. These molecular assessments were repeated in the third month post-kindling. EEG recordings revealed interictal events during the first post-kindling month. In the second and third months, a significant increase in GFAP expression was observed in hippocampal regions (CA1, CA3, and dentate gyrus), while NeuN expression remained unchanged. These findings contribute to the characterization of the post-kindling phase and enhance the understanding of the PTZ model's underlying mechanisms and temporal progression.

Keywords: Pentilentetrazol, Chronic kindling, GFAP, NeuN, Hippocampus.

Introducción

Epilepsia, es una enfermedad neurológica crónica caracterizada por convulsiones recurrentes e impredecibles (Beghi et al., 2015). En las últimas décadas, se han desarrollado y adoptado diversos modelos que permiten comprender mejor la fisiopatología de esta enfermedad (Lévesque et al., 2016). Entre los diferentes modelos, el kindling con pentilentetrazol (PTZ) es uno de los más usados para estudiar mecanismos de convulsiones, epileptogénesis y comorbilidades a largo plazo (Goel et al., 2015; Shahpari et al., 2019). PTZ destaca por su alta biodisponibilidad, su distribución uniforme en el cerebro y breve latencia de acción (Samokhina & Samokhin, 2018), actúa como antagonista de receptores GABA (ácido gamma-aminobutírico), principalmente GABA-A suprimiendo la inhibición GABAérgica lo cual provoca la hiperexcitación progresiva, y sobreactivación de receptores glutamatérgicos (Aleshin et al., 2023; Ngoupaye et al., 2022) que al ser administrado de manera continua logra inducir un estado epiléptico crónico caracterizado por la reducción gradual en el umbral convulsivo e incremento en la gravedad de convulsiones (Gáll et al., 2022; Popova et al., 2017). Se suele evaluar el desarrollo del kindling mediante la escala de Racine (Racine, 1972) un método

validado y sencillo de aplicar, pero que no permite describir con precisión los eventos comportamentales. Es por ello, que en la investigación se implementó el uso de la electroencefalografía (EEG) que permitió identificar descargas epileptiformes, que son patrones del EEG anormales, arrítmicos, aperiódicos, distinguibles del fondo (Hirsch, et. al. 2021). Recientemente, este biomarcador se ha identificado como un indicador específico de epileptogénesis en pacientes (Bentes, 2018), y en modelos animales (White, 2010). A pesar que el modelo de kindling con PTZ es ampliamente usado para el screening de nuevos tratamientos antiepilépticos (Shimada T. y Yamagata K., 2018), estudios del periodo post-kindling son poco frecuentes.

Se ha argumentado que, aunque los modelos de kindling inducen procesos asociados a la epileptogénesis como la muerte neuronal y la neuroinflamación, estos cambios son leves y no suficientes para generar una excitabilidad autosostenida, siendo más una consecuencia que una causa de las crisis inducidas por estimulación (Pitkänen A, y Halonen T., 1998). Sin embargo existen precedentes de que el kindling por PTZ puede generar a largo plazo EEG anormal (Bartsch., 2014) e incluso crisis espontáneas (Popova I. et.al., 2017), lo cual es evidencia de que los cambios inducidos

por el modelo podrían generar un proceso autosostenido de epileptogénesis, independiente de las inyecciones sub-convulsivas del protocolo. Por ello, investigar a largo plazo los efectos del kindling es crucial para comprender las alteraciones cerebrales persistentes no directamente asociadas a la administración del fármaco. En tal sentido, el objetivo de la presente investigación es describir las alteraciones cerebrales persistentes que ocurren luego de la inducción de un modelo de kindling de PTZ propuesto por Ngoupaye et al. (2022), que involucra una dosis convulsivante seguida de dosis sub-convulsivantes de PTZ, mediante una caracterización histológica y electrofisiológica.

Metodología

Ubicación

La investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Neurociencias (LIN) de la Universidad Andina del Cusco (UAC), ubicado en la ciudad de Cusco, distrito de San Jerónimo-Collana a una altitud de 3,197 msnm.

Animales

Se emplearon ratas macho Sprague Dawley de 4 a 6 semanas de edad, con un peso entre 200-250 g al inicio de la experimentación. Se mantuvieron alojados en el

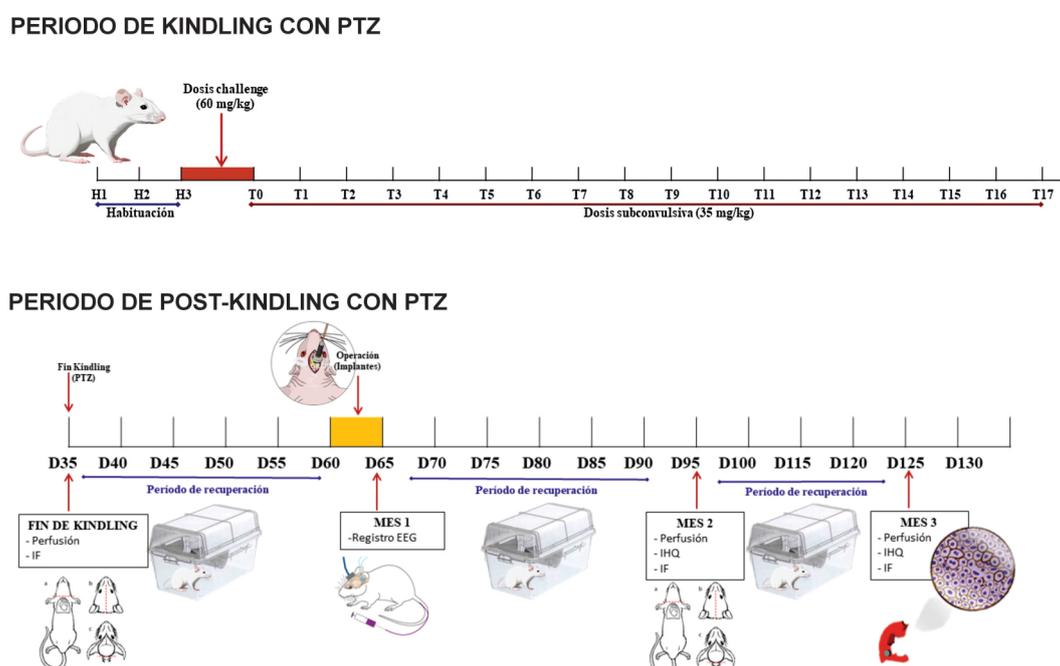
bioterio automatizado de la Universidad Andina del Cusco a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, con humedad relativa del $45 \pm 10\%$ y un ciclo diurno de 06:00 a 18:00 h. Se les alimentó con una dieta estándar para roedores y agua *ad libitum*. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Ética de la UAC (Resolución N° 474-CU-2023-UAC).

Inducción de kindling crónico con el modelo de pentilentetrazol

Este estudio fue diseñado para evaluar los efectos a largo plazo del modelo de kindling con PTZ, para ello un total de 18 ratas se dividieron aleatoriamente en 2 grupos experimentales ($n=6$ para el grupo control y $n=12$ para el grupo PTZ), cada grupo se dividió para ensayos inmunológicos (segundo y tercer mes post kindling) y registros de EEG (primer mes post kindling). La inducción de kindling se realizó empleando la metodología empleada por Ngoupaye et al. (2022) que consistió en tres etapas: habituación (H 1-3), challenge (T0) y kindling (Trial o T 1-17) (Figura 1). En la etapa de habituación, a todos los animales se les administró solución salina fisiológica (0.9% NaCl, 1.5 ml/kg), en el T0, al grupo PTZ se le administró una dosis convulsiva de PTZ (60 mg/kg, 1.5 ml/kg, i.p. Sigma Aldrich N° de cat. EC200-219-3) y durante los

Figura 1

Diagrama experimental del protocolo de kindling con PTZ y secuencia de evaluaciones realizadas después de la inducción de kindling con PTZ en ratas Sprague Dawley.



Trial 1-17 se le administró una dosis sub-convulsiva de PTZ (35 mg/kg, 1.5 ml/kg, i.p.); al grupo control se le administró solamente solución salina fisiológica (0.9% NaCl, 1.5 ml/kg, i.p.) paralelamente a las inyecciones del grupo PTZ. Tras cada inyección, cada animal fue colocado en una caja individual y fue registrado por video durante 30 minutos para la evaluación de la intensidad de las crisis convulsivas utilizando la escala de Racine (1972): 0) Sin convulsiones o anomalías en el comportamiento; 1) Catalepsia; 2) Espasmos faciales y de cuello; 3) Espasmos de patas delanteras; 4) Convulsiones tónicas; 5) Convulsiones tónico-clónicas; se consideró que los animales se encontraban en estado de kindling cuando presentaron dos convulsiones consecutivas de etapa 4 y/o 5 luego de la administración de PTZ. La administración de PTZ y NaCl se realizó cada 48 h a las 10:00 h. Al concluir el kindling los animales fueron trasladados al bioterio donde permanecieron durante semanas antes de ser reevaluados.

Immunohistoquímica e Inmunofluorescencia

Luego de concluido el kindling, se eligió aleatoriamente a dos animales del grupo control y dos animales del grupo PTZ, de igual manera se eligió a dos animales del grupo PTZ en el segundo y tercer mes (Figura 1). Se les realizó perfusión intracardiaca con paraformaldehído al 4% y se prepararon secciones coronales de 50 μ m del hipocampo de cada animal. Para la inmunohistoquímica se marcó la presencia de astrocitos mediante el uso del anticuerpo anti-GFAP (GFAP Mouse Monoclonal Antibody, MA5-12023, Invitrogen) utilizado en 1:1000 y neuronas maduras con el anticuerpo anti-NeuN (Anti-NeuN Guinea Pig Polyclonal Antibody, ABN90, Merck) utilizado en 1:1000. Los tejidos se lavaron inicialmente con PBS 1X. A partir de este paso, todos los lavados se realizaron en tres ciclos de 5 minutos cada uno con PBS 1X suplementado con Tween 20 al 0.01% (PBS 1X + 0.01% Tween 20), a temperatura ambiente. Para el bloqueo de la peroxidasa, los cortes fueron incubados en peróxido de hidrógeno al 0.3% por 15 minutos y se realizaron los tres ciclos de lavado. El bloqueo de proteínas no específicas se realizó con 5% de suero normal de cabra (NGS) en PBS 1X + 0.01% Tween 20 durante 1 hora. Se incubó el tejido con anticuerpo primario disuelto en NGS al 2.5% en PBS 1X + Tween

0.01% a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron tres ciclos de lavado. Luego, el anticuerpo secundario fue incubado por 1 hora, seguido de 3 ciclos de lavado. Para estos anticuerpos no conjugados, se utilizó el kit ABC, (Complejo Avidina-Biotina) (PK-4000, Vector) por 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 ciclos de lavado. Finalmente se realizó el revelado con DAB. Una vez detenida la reacción con (PBS 1X + Tween 0.01%), se transfiere el tejido a una lámina portaobjetos, se cubre con Entellan (Merck, Cat. No. 107960) y una lámina cubreobjetos.

Para el marcaje por inmunofluorescencia se realizó mediante un doble marcado para GFAP (+) (GFAP Guinea pig pAb antiserum, Synaptic Systems) y NeuN (+) (NeuN Recombinant Rabbit Monoclonal, Invitrogen) en hipocampo, se volvió a realizar el mismo ciclo de lavado, se bloquearon con una solución de PBS 1X + Tween 20 al 0.01% y NGS al 5%, y luego se incubaron con anticuerpos primarios durante toda la noche en PBS 1X + Tween 20 al 0.01% + NGS al 2.5%. Después de lavar nuevamente, se incuban con anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos (Alexa Fluor 594-conjugated AffiniPure Goat Anti-Guinea Pig, Jackson ImmunoResearch y Fluorescein (FETC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-rabbit, Jackson Immuno Research, respectivamente) durante 1 hora. Se lavaron tres veces más y se colocaron en portaobjetos, añadiendo medio de montaje antidecoloración (Vectashield, H-1700). Se observó en un microscopio de fluorescencia a 10X de aumento. Se evaluó específicamente las zonas de Giro Dentado (GD), CA1 (*Cornu Ammonis* 1), y CA3 (*Cornu Ammonis* 3) en ambas técnicas.

Electrocorticografía y Detección de Crisis Epileptiformes

Luego del proceso de kindling se eligió aleatoriamente a tres animales de cada grupo experimental y se les realizó el implante de electrodos epidurales mediante cirugía estereotáxica, sin embargo, al ser un procedimiento invasivo y presentar una alta probabilidad de generar complicaciones, solamente sobrevivieron dos de cada grupo experimental. Se anestesió a las ratas con xilacina (Dormi-Xyl, 5mg/Kg, i.p.) y ketamina (Halatal, 70 g/Kg, i.p.) y se les montó en un aparato estereotáxico motorizado (Stoelting company).

Luego de descubrir el cráneo mediante una incisión se identificó el bregma como punto de referencia y se insertó el electrodo (1/8", Pinnacle Technology Inc., Número de pieza 8247) en las siguientes coordenadas: x: +/-2.0, y: -3.8 mm (registro); x: +/-2.0, y: +2.0 (anclaje y referencia), y se colocaron los filamentos para registro de electromiograma bajo la piel en dirección a la nuca.

Registros de EEG y Grabaciones en Video

Los registros se realizaron luego de un mes de concluido el kindling. Para el registro de EEG se usó el sistema de registro Pinnacle 8200 series (Pinnacle Technology). Las ratas fueron albergadas en cajas especiales que permiten el libre movimiento, con acceso a comida y agua *ad libitum*. Se registró durante 24 horas, desde el inicio del ciclo de oscuridad al fin del ciclo de luz estándar (desde las 18 h). La adquisición de datos se realizó mediante el programa Sirenia Seizure Acquisition (Pinnacle Technology). Los datos fueron registrados en dos canales a 2 kHz, con un filtro high pass a 0.5 Hz y un filtro lowpass a 1kHz. El pre-procesamiento de datos se realizó de manera offline y consistió en un downsampling a 256 Hz y un filtro lowpass a 100 Hz, debido a que las frecuencias de interés están en las bandas más lentas. Los registros fueron normalizados sustrayendo sus propias medias y escalándolos a sus desviaciones estándar. Para el análisis y clasificación de datos se implementó un método basado en un modelo lineal generalizado (GLM). Se empleó como predictores de este modelo características reducidas mediante análisis de componentes principales (PCA), siguiendo la descripción a rasgos generales de un algoritmo similar en Fumeaux et. al. (2020). El procedimiento de implementación del algoritmo se realizó mediante la biblioteca MNE (versión 1.8, Gramfort. et al., 2013) del lenguaje de programación Python (versión 3.11.8). Se identificaron dos clases: Segmento ictal que contiene descargas de gran amplitud, incremento de poder en las frecuencias delta, theta y alfa, y una morfología característica (picos generados de manera rítmica, asimetría de los picos, poly-spikes, o complejos onda-pico) (Yang H. et. al., 2019, Van Erum. et. al., 2019, Ogihlarian. et. al., 2009) y segmento no-ictal a los datos que no pertenecían a la clase ictal. El conjunto de datos de entrenamiento fue conformado por datos de experimentos anteriores.

Resultados y Discusiones

Inducción de Kindling Crónico con el Modelo de Pentilentetrazol

La inducción de kindling crónico con el modelo de PTZ propuesto en la investigación, se realizó de manera exitosa, se evidenció que la administración de 17 dosis sub-convulsivas (35 mg/kg) luego de una dosis convulsiva inicial denominada dosis *challenge* (60 mg/kg) de PTZ por vía intraperitoneal en días alternos resultó en el incremento gradual de la actividad convulsiva y una menor mortalidad, este protocolo fue descrito inicialmente por Ngoupaye et al. (2022), los resultados del desarrollo de kindling de la investigación son semejantes con los resultados de Shahpari et al. (2019), quienes mencionan que al emplear un programa de administración de PTZ cada dos días se logra un resultado consistente de kindling. El protocolo de kindling culminó con una tasa de supervivencia del 80% en donde se observó que el 100% de los animales que concluyeron con el protocolo presentaron crisis convulsivas de estadio 4 y 5 en la escala de Racine durante la etapa Challenge; mientras que en el desarrollo de la etapa kindling se observó el incremento de la frecuencia de las convulsiones de tipo tónica y tónico clónicas, alcanzando una incidencia del 100% del nivel 4 de la escala de Racine por al menos dos sesiones consecutivas, mientras que el 75% presentó el nivel 5 en al menos una ocasión, concluyendo que el 100% de los animales sobrevivientes alcanzaron el estado de kindling, que se alcanzó luego de 3.6 inyecciones. Este resultado es ligeramente distinto a lo encontrado por Ngoupaye et al. (2022) quienes reportaron alcanzar el estadio 4 con 6.33 inyecciones. Con respecto al esta día 5 de la escala de Racine, donde se pueden observar convulsiones tónico-clónicas severas, en nuestro estudio se requirió más de 12 inyecciones. Este número es mucho mayor que las 8.83 inyecciones necesarias reportadas por Ngoupaye et al. (2022).

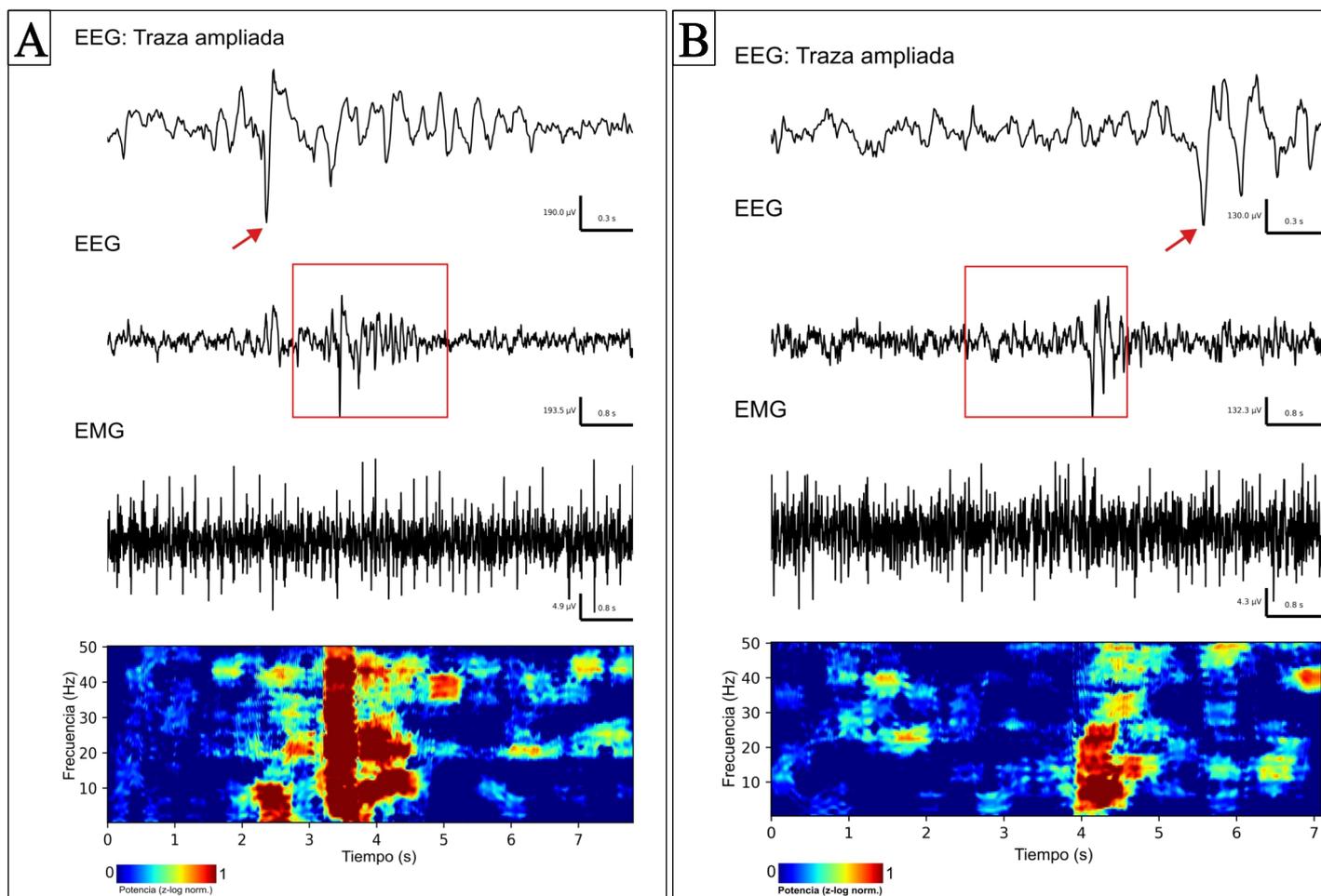
Esta información es importante, debido a que la aparición de cada convulsión puede ser un buen indicador para lograr la categorización de las diferentes etapas del kindling inducido por PTZ (Shahpari et al., 2019).

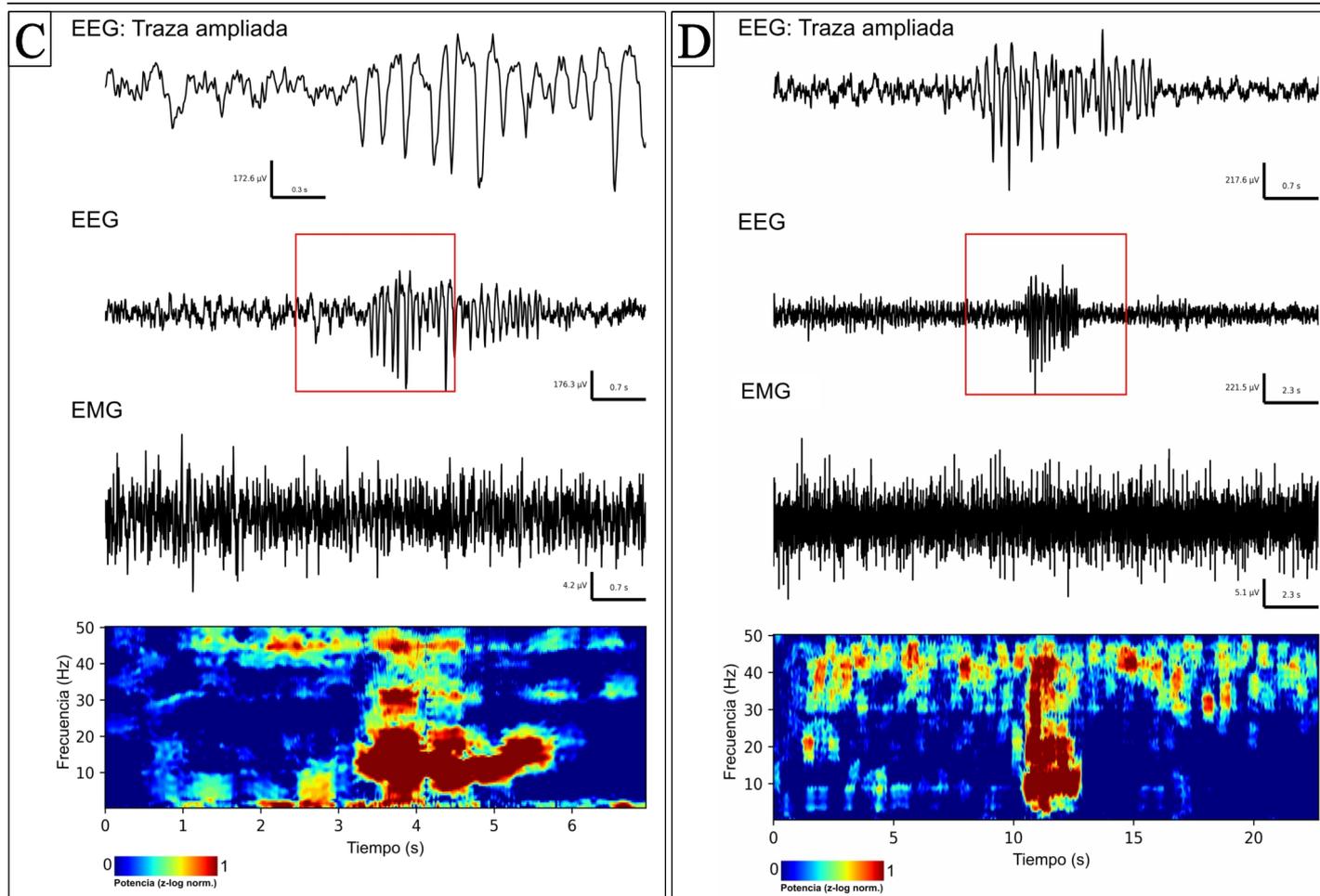
Los animales del grupo control, no presentaron convulsiones a lo largo del experimento, ni mostraron alteraciones en los patrones de comportamiento evaluados. Se ha descrito que el completo estado de kindling está correlacionado positivamente con la degeneración neuronal del hipocampo (Fang & Lei, 2010). Es por ello que al finalizar el protocolo de kindling se optó por realizar la primera prueba de inmunofluorescencia a animales del grupo control y PTZ en el Giro Dentado y CA3 (Figura 5 y 6, PTZ 35d), en donde no se evidenciaron diferencias significativas en la expresión de GFAP. Sin embargo, se optó por realizar el implante de electrodos a los animales tanto del grupo control como PTZ; la razón detrás de esta decisión se basa en lo descrito por Lüttjohann et al. (2009), quienes evidencian que la escala de Racine no es suficiente para describir todo el proceso de epileptogénesis y que es requisito indispensable usar registros electroencefalográficos para discretizar adecuadamente los eventos comportamentales epilépticos, con el propósito de poder detectar con precisión diferencias en registros de EEG que sugiera

eventos epileptiformes. Debido a la presunción inicial de procesos epileptogénico generados de manera independiente a la administración de PTZ, se optó por el uso de EEG, esperando identificar anomalías electrográficas, como se observaron en Bartsch (2014), por lo que se esperó observar eventos interictales. Y, efectivamente, mediante el proceso de detección se pudo encontrar dichos eventos, de los cuáles se muestran ejemplos representativos en la Figura 2, acompañados de espectrogramas de frecuencia de los eventos que permiten apreciar el cambio súbito de poder que acompaña a dichos eventos. Estos fueron clasificados de acuerdo a los criterios de Hirsch L. et. al (2021): Spikes, que se tratan de eventos de corta duración (<70 ms) que consisten en un solo pico (Figura 2A); sharp waves que, similarmente, consisten de un solo pico, pero de mayor duración (entre 70 ms y 20 ms, Figura 2B); polyspikes, que es un evento compuesto por muchos picos, pero de relativa corta duración (< a 500 ms, Figura 2C) y descargas epileptiformes que son un clúster de picos de larga duración (>500 ms, Figura 2D).

Figura 2

Trazas y espectrogramas representativos de eventos detectados, clasificados de acuerdo a los criterios de Hirsch L. et. al (2021).



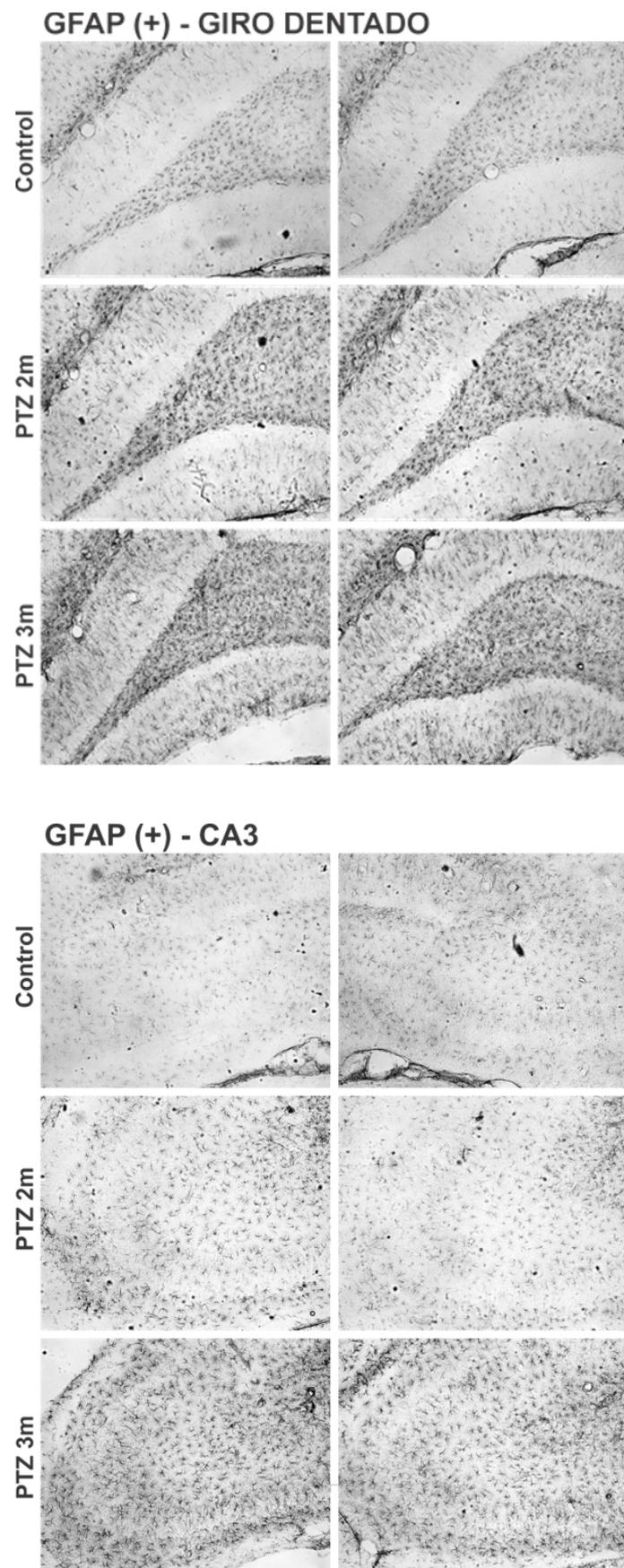


El grupo PTZ se evidenciaron 17 spikes, 29 sharp waves, 46 polyspikes y 3 descargas epileptiformes, mientras que el grupo control en la ventana de tiempo del registro no se encontró estos eventos. Posteriores registros no pudieron realizarse a un intervalo regular mensual, debido a que los electrodos se desprendieron luego de los registros del primer mes por desgaste. En este estudio se encontraron descargas epileptiformes en ratas sometidas a kindling por PTZ al primer mes, pero no crisis motoras, siendo estas similares a las encontradas por Bartsch (2014). Y al mismo tiempo, estas son remarcablemente similares a descargas encontradas en la fase latente que precede a la aparición de crisis espontáneas recurrentes en modelos en los que estas son predecibles como el de pilocarpina (Chauvière, 2012) y el de ácido kaínico (White, 2010). Es por este motivo que se trata de un indicador general de la presencia de hiperexcitabilidad. Aunque el rol que cumplen estos eventos en este estado de hiperexcitabilidad aún se discute (ya sea uno anti-ictiogénico o pro-ictiogénico, véase Chvojka, et. al (2021) para una revisión reciente al respecto), este hallazgo en nuestra investigación fue un indicio de

alteraciones a nivel funcional subyacentes a nivel histológico. Por este motivo se continuó con la evaluación de los animales a los dos y tres meses posteriores a la última administración de PTZ para evaluar el efecto del protocolo en el hipocampo, para ello se realizaron estudios inmunohistoquímicos y de inmunofluorescencia. La administración crónica de PTZ produjo astrogliosis progresiva a los dos y tres meses, tanto en Giro Dentado como en *Cornu Ammonis 3* (CA3) se observó un incremento del número de células GFAP (+) (astrocitos) en ratas expuestas a PTZ comparadas con los controles (Figura 3, CA3). Sin embargo, no se evidenció disminución neuronal. No obstante, al compararse la presencia de células NeuN (+) en hipocampo de rata expuesta a PTZ comparada con rata control, no se observaron diferencias significativas en GD, CA1 y CA3 (Figura 4). Las ratas de 3 meses post-PTZ mostraron indicios de cambios topológicos en la capa granular del Giro Dentado. Se observó que el hipocampo de ratas expuestas a PTZ presentaban signos de astrogliosis, posiblemente asociada a inflamación, incluso meses después de haber recibido el protocolo.

Figura 3

Inmunohistoquímica de Giro Dentado (GD) y CA3 de hipocampo de rata control, 2 meses post-PTZ y 3 meses post-PTZ. La marcación corresponde a células GFAP (+).



Este hallazgo es coherente con lo publicado por Díaz et al. (2023) quienes también observaron signos de astrogliosis en hipocampo de ratón expuesto a tan solo 13 días de PTZ; al igual que Bayat et al. (2023), quienes mostraron que después de la inducción de convulsiones por PTZ mediante dosis sub-convulsivas (12 a 15 aplicaciones, 40 mg/kg) cada 48 horas en ratas Sprague Dawley, el número de células positivas a GFAP en el grupo administrado con PTZ incrementó significativamente en comparación con el grupo control; tal como Kaur et al. (2015), quienes mostraron un incremento significativo en la expresión de ARNm de GFAP en el hipocampo luego del tratamiento crónico con PTZ. Con respecto a la expresión de NeuN, en el presente estudio no se observaron cambios significativos entre los grupos control y PTZ. Este hallazgo concuerda con lo publicado por otros artículos en los cuales, precisamente en el modelo de kindling por PTZ, se observa una marcada neurogénesis en lugar de muerte neuronal (Velazco-Cercas et al., 2020; Zhu et al., 2016). La neurogénesis hipocámpal en modelos de epilepsia está asociada principalmente a la formación aberrante de fibras musgosas en un intento compensatorio del hipocampo frente a la excitotoxicidad que experimenta durante los protocolos (Kulikov et al., 2021). Los resultados de la doble inmunofluorescencia evidencian un notable incremento de células GFAP (+) en rojo, en Giro Dentado de ratas 2 y 3 meses post-PTZ comparados con el control (Figura 5 y 6). Este incremento se evidencia con mayor intensidad en hilus y en la capa molecular tanto interna como externa. Asimismo, también se observó incremento de células GFAP (+) en parte de CA1, en el *stratum lacunosum-moleculare*. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en células NeuN (+) de color verde, entre el grupo PTZ y control. En CA3 también se observó un incremento de células GFAP (+) en *stratum radiatum*, *lucidum* y *oriens* de ratas 2 y 3 meses post-PTZ comparadas con los controles. Por otro lado, se observó un aparente incremento de células NeuN (+) en el *stratum pyramidale* de aquellas ratas que recibieron PTZ comparadas con sus controles (Figura 6).

Figura 4

Inmunohistoquímica de Giro Dentado, CA1 y CA3 de hipocampo de rata control, 2 meses post-PTZ y 3 meses post-PTZ. La marcación corresponde a células NeuN (+).

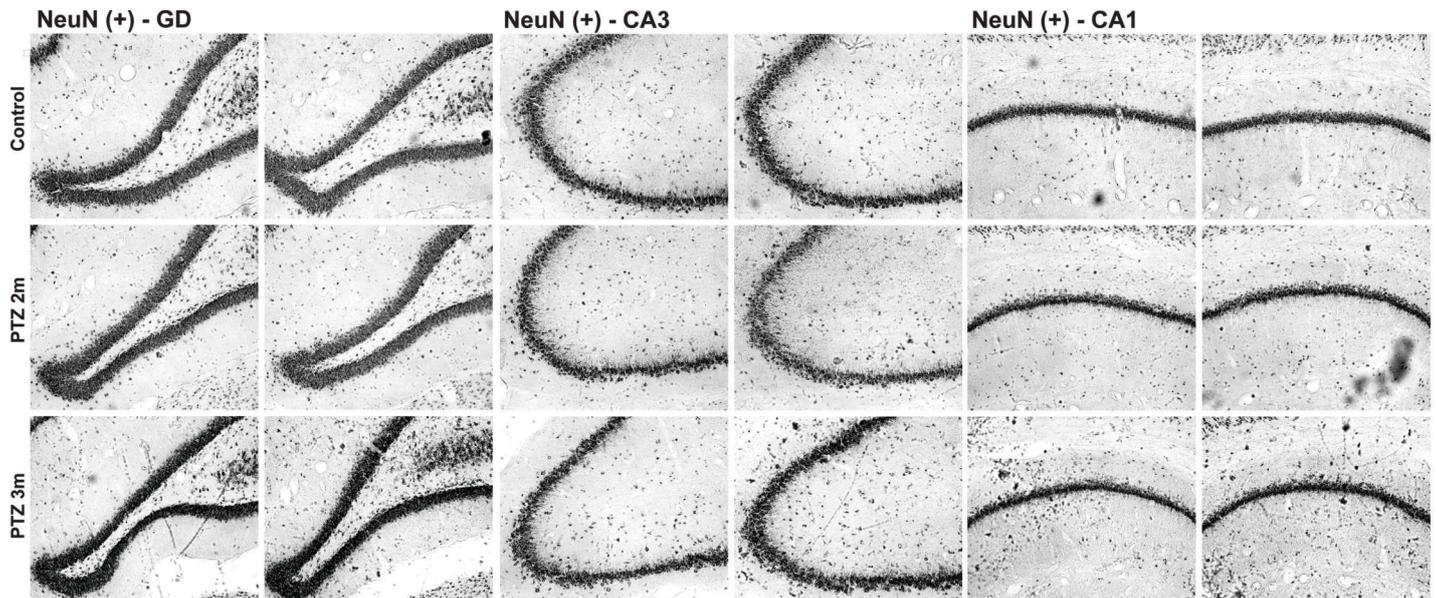


Figura 5

Doble inmunofluorescencia de Giro Dentado del hipocampo de rata control, al finalizar el kindling (PTZ 35d), 2 meses post-PTZ y 3 meses post-PTZ. La marcación corresponde a células NeuN (+) en verde y GFAP (+) en rojo.

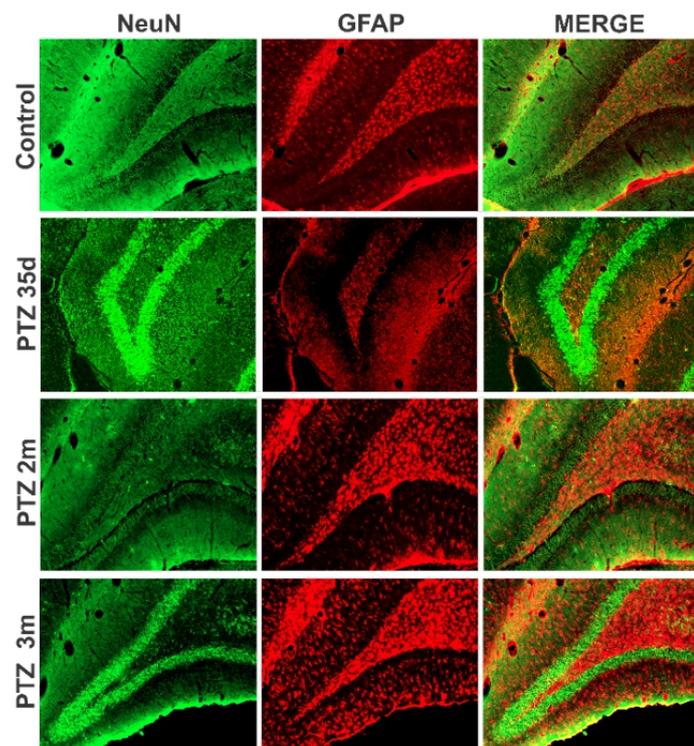
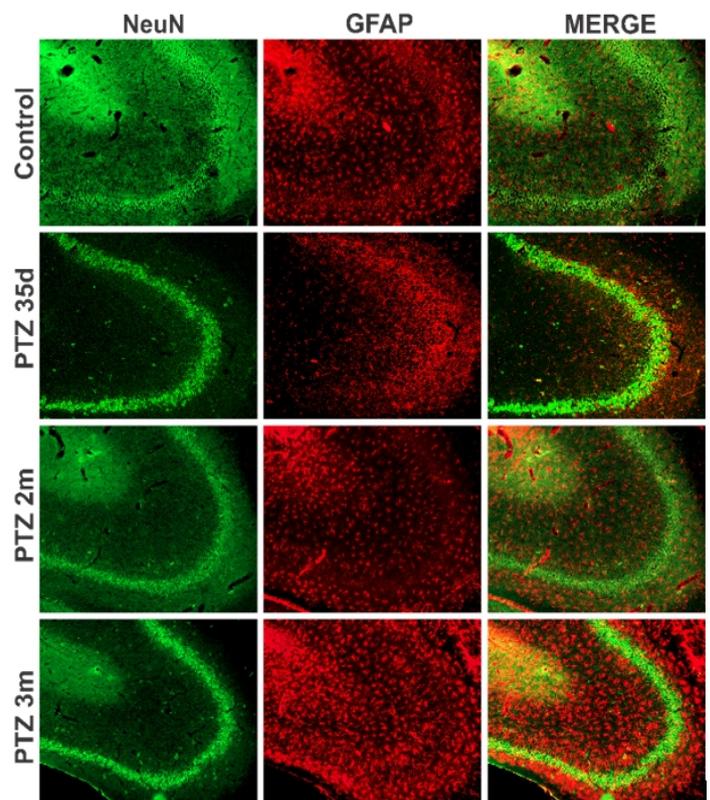


Figura 6

Doble inmunofluorescencia de CA3 de rata control, 2 meses post-PTZ y 3 meses post-PTZ. La marcación corresponde a células NeuN (+) en verde y GFAP (+) en rojo.



Los resultados obtenidos, coinciden con Fang & Lei (2010) quienes evidenciaron astrocitosis mediante inmunotinción con GFAP en animales tratados con PTZ al identificar el incremento significativo en la reactividad de GFAP en GD; CA3 y CA1 y concluyen que el tratamiento crónico con PTZ induce gran actividad de astrocitos y microglía en el hipocampo,

al igual que Gáll et al.(2022), quienes confirmaron que el kindling de PTZ induce a astrogliosis en las regiones CA3 y CA1 del hipocampo. Kaur et al. (2015), observaron que tras la administración recurrente de PTZ a dosis sub-convulsivas durante 30 días a ratas Wistar, estas presentaron convulsiones tónico clónicas generalizadas graves, además observaron la activación astrocítica al identificar astrocitos hipertrofiados marcados con GFAP como respuesta inflamatoria en el hipocampo; además sugieren también que la proteína GFAP se expresa tardíamente de lo previsto con la tinción inmunohistoquímica, lo que podría explicar porque no se observaron cambios significativos en los niveles de proteína GFAP al mes de iniciar las evaluaciones de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Ravizza et al. (2008), demuestran que procesos inflamatorios específicos en el cerebro causados por un evento desencadenante como lo es el estatus epilepticus, se mantiene durante la epileptogénesis, también que se generan eventos inflamatorios precedentes a la aparición de la epileptogénesis en modelos experimentales, además que la incidencia de convulsiones espontáneas podría contribuir con la prolongación de la inflamación en las regiones epileptogénicas como el hipocampo, mientras que Cekanaviciute & Buckwalter (2016) mencionan que los astrocitos se vuelven reactivos al identificar una lesión, lo que indica que la inflamación cerebral, es un proceso crónico que puede desarrollarse después de un evento de kindling inicial y podría persistir en el tejido epileptogénico a pesar de que la actividad convulsiva evidente haya concluido. La evidencia contribuye cada vez más con la idea de que las convulsiones epilépticas conducen al desarrollo de neuroinflamación crónica (Yang et al., 2023) y que las células gliales, como los astrocitos, cumplen un rol esencial en la inflamación en la epilepsia crónica y farmacorresistentes, lo que podría influir en la transmisión sináptica generando una excitabilidad alterada facilitando la continuación de convulsiones (Kaur et al., 2015; Vezzani et al., 2011).

Se debe mencionar como limitación del estudio que solo se empleó un marcador inmunológico específico de una célula glial (es decir astrocitos, GFAP), sin embargo, se recomienda incrementar

marcadores como IBA1 (como marcador de células microgliales). Además, a pesar de que los resultados son evidentes, se recomienda incrementar el número de animales en experimentación para investigaciones posteriores. Así también como incrementar el número de registros electroencefalográficos para 2 y 3 meses posteriores al kindling. Por otro lado, es necesario generar más entrenamiento de los algoritmos de detección de eventos interictales, debido a que el que se empleó en la investigación recurre a reconocer falsos positivos por lo que se procedió a la identificación de manera visual.

Conclusión

De manera consistente a la literatura previa, se evidenció actividad interictal al primer mes en los animales sometidos al protocolo de kindling por PTZ, indicio que motivó una exploración más amplia a nivel histológico luego de concluido el protocolo de kindling. Los resultados de esta exploración permitieron concluir que la administración crónica de PTZ produjo astrogliosis luego de dos y tres meses de concluido el protocolo de kindling, sin embargo, no se observó disminución neuronal en el hipocampo. Estos resultados proporcionan un importante indicio sobre los cambios a largo plazo del modelo de kindling crónico, lo que refuerza la importancia de continuar con estudios de respuestas gliales en modelos experimentales de epilepsia.

Agradecimientos

La investigación contó con el financiamiento de PROCIENCIA (Nro. de Contrato PE5010822002023) bajo la dirección del Dr. Luis Fernando Pacheco Otarola. Los autores agradecen el apoyo de Carlos Medina Saldivar y Sergio Cruz Visalaya por su aporte en los diseños experimentales desarrollados durante la ejecución de esta investigación.

Referencias Bibliográficas

- Aleshin, V. A., Graf, A. V., Artiukhov, A. V., Ksenofontov, A. L., Zavileyskiy, L. G., Maslova, M. V., & Bunik, V. I. (2023). Pentylene-tetrazole-Induced Seizures Are Increased after Kindling, Exhibiting Vitamin-Responsive Correlations to the Post-Seizures Behavior, Amino Acids Metabolism and Key Metabolic Regulators in the Rat Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12405. <https://doi.org/10.3390/ijms241512405>
- Beghi, E., Giussani, G., & Sander, J. W. (2015). The natural history and prognosis of epilepsy. *Epileptic Disorders: International Epilepsy Journal with Videotape*, 17(3), 243-253. <https://doi.org/10.1684/epd.2015.0751>
- Bartsch, V., Díaz, J., González, I., Cavada, G., Ocampo-Garcés, A., & Wyneken, U. (2014). Electroencephalographic characterization of pentylene-tetrazole kindling in rats and modulation of epileptiform discharges by nitric oxide. *Neurochemical research*, 39(2), 408–418. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1237-y>
- Bentes, C., Martins, H., Peralta, A. R., Morgado, C., Casimiro, C., Franco, A. C., Fonseca, A. C., Geraldes, R., Canhão, P., Pinho E Melo, T., Paiva, T., & Ferro, J. M. (2018). Early EEG predicts poststroke epilepsy. *Epilepsia open*, 3(2), 203–212. <https://doi.org/10.1002/epi4.12103>
- Chauvière, L., Doublet, T., Ghestem, A., Siyoucef, S. S., Wendling, F., Huys, R., Jirsa, V., Bartolomei, F., & Bernard, C. (2012). Changes in interictal spike features precede the onset of temporal lobe epilepsy. *Annals of neurology*, 71(6), 805–814. <https://doi.org/10.1002/ana.23549>
- Cekanaviciute, E., & Buckwalter, M. S. (2016). Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases. *Neurotherapeutics*, 13(4), 685-701. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0477-8>
- Díaz, F., Aguilar, F., Wellmann, M., Martorell, A., González-Arancibia, C., Chacana-Véliz, L., Negrón-Oyarzo, I., Chávez, A. E., Fuenzalida, M., Nualart, F., Sotomayor-Zárate, R., & Bonansco, C. (2023). Enhanced Astrocyte Activity and Excitatory Synaptic Function in the Hippocampus of Pentylene-tetrazole Kindling Model of Epilepsy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/ijms241914506>
- Fang, F., & Lei, H. (2010). El aumento de T2 hipocampal en un modelo de rata de kindling inducido por pentilene-tetrazol se correlaciona con las puntuaciones de convulsiones. *Journal of the Neurological Sciences*, 292(1), 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2010.02.014>
- Fumeaux, N. F., Ebrahim, S., Coughlin, B. F., Kadambi, A., Azmi, A., Xu, J. X., Abou Jaoude, M., Nagaraj, S. B., Thomson, K. E., Newell, T. G., Metcalf, C. S., Wilcox, K. S., Kimchi, E. Y., Moraes, M. F. D., & Cash, S. S. (2020). Accurate detection of spontaneous seizures using a generalized linear model with external validation. *Epilepsia*, 61(9), 1906–1918. <https://doi.org/10.1111/epi.16628>
- Gáll, Z., Kelemen, K., Tolokán, A., Zolcsek, I., Sável, I., Bod, R., Ferencz, E., Vancea, S., Urkon, M., & Kolcsár, M. (2022). Anticonvulsant Action and Long-Term Effects of Chronic Cannabidiol Treatment in the Rat Pentylene-tetrazole-Kindling Model of Epilepsy. *Biomedicines*, 10(8), 1811. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081811>

- Goel, R. K., Gawande, D., Lagunin, A., Randhawa, P., Mishra, A., & Poroikov, V. (2015). Revealing Medicinal Plants That Are Useful for the Comprehensive Management of Epilepsy and Associated Comorbidities through In Silico Mining of Their Phytochemical Diversity. *Planta Medica*, 81, 495-506. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1545884>
- Hirsch, L. J., Fong, M. W. K., Leitinger, M., LaRoche, S. M., Beniczky, S., Abend, N. S., Lee, J. W., Wusthoff, C. J., Hahn, C. D., Westover, M. B., Gerard, E. E., Herman, S. T., Haider, H. A., Osman, G., Rodriguez-Ruiz, A., Maciel, C. B., Gilmore, E. J., Fernandez, A., Rosenthal, E. S., Claassen, J., ... Gaspard, N. (2021). American Clinical Neurophysiology Society's Standardized Critical Care EEG Terminology: 2021 Version. *Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society*, 38(1), 1-29. <https://doi.org/10.1097/WNP.0000000000000806>
- Kaur, H., Patro, I., Tikoo, K., & Sandhir, R. (2015). Curcumin attenuates inflammatory response and cognitive deficits in experimental model of chronic epilepsy. *Neurochemistry International*, 89, 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.07.009>
- Kulikova, A. A., Naumova, A. A., Aleksandrova, E. P., Glazova, M. V., & Chernigovskaya, E. V. (2021). Audiogenic kindling stimulates aberrant neurogenesis, synaptopodin expression, and mossy fiber sprouting in the hippocampus of rats genetically prone to audiogenic seizures. *Epilepsy & Behavior: E & B*, 125, 108445. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.108445>
- Lévesque, M., Avoli, M., & Bernard, C. (2016). Animal models of temporal lobe epilepsy following systemic chemoconvulsant administration. *Journal of neuroscience methods*, 260, 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.03.009>
- Lüttjohann, A., Fabene, P. F., & van Luijckelaar, G. (2009). A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiology & Behavior*, 98(5), 579-586. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.09.005>
- Ngoupaye, G. T., Adassi, M. B., Foutsop, A. F., Yassi, F. B., & Bum, E. N. (2022). Pentylentetrazole kindling-induced epilepsy rat models: Insight on the severity state, a comparative study. *IBRO Neuroscience Reports*, 13, 164. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.08.003>
- Popova, I., Malkov, A., Ivanov, A. I., Samokhina, E., Buldakova, S., Gubkina, O., Osypov, A., Muhammadiev, R. S., Zilberter, T., Molchanov, M., Paskevich, S., Zilberter, M., & Zilberter, Y. (2017). Metabolic correction by pyruvate halts acquired epilepsy in multiple rodent models. *Neurobiology of Disease*, 106, 244-254. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.07.012>
- Oghlakian, R. O., Tilelli, C. Q., Hiremath, G. K., Alexopoulos, A. V., & Najm, I. M. (2009). Single injection of a low dose of pentylentetrazole leads to epileptogenesis in an animal model of cortical dysplasia. *Epilepsia*, 50(4), 801-810. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01815.x>
- Popova, I., Malkov, A., Ivanov, A. I., Samokhina, E., Buldakova, S., Gubkina, O., Osypov, A., Muhammadiev, R. S., Zilberter, T., Molchanov, M., Paskevich, S., Zilberter, M., & Zilberter, Y. (2017). Metabolic correction by pyruvate halts acquired epilepsy in multiple rodent models. *Neurobiology of disease*, 106, 244-254. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.07.012>
- Pitkänen, A., & Halonen, T. (1998). Prevention of epilepsy. *Trends in pharmacological sciences*, 19(7), 253-255. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(98\)01224-3](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(98)01224-3)

- Racine, R. J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation: I. after-discharge threshold. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 32(3), 269-279. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90176-9](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90176-9)
- Ravizza, T., Gagliardi, B., Noé, F., Boer, K., Aronica, E., & Vezzani, A. (2008). Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: Evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 29(1), 142-160. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.08.012>
- Shimada, T., & Yamagata, K. (2018). Pentylentetrazole-Induced Kindling Mouse Model. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (136), 56573. <https://doi.org/10.3791/56573>
- Samokhina, E., & Samokhin, A. (2018). Neuropathological profile of the pentylentetrazol (PTZ) kindling model. *International Journal of Neuroscience*, 128(11), 1086-1096. <https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1481064>
- Shahpari, M., Aligholi, H., Namavar, M. R., Vafae, F., & Emamghoreishi, M. (2019). Improved Stage Categorization of PTZ-Induced Kindling and Late Enhanced Neurogenesis in PTZ Kindled Mice. *Galen Medical Journal*, 8, e1511. <https://doi.org/10.22086/gmj.v8i0.1511>
- Van Erum, J., Van Dam, D., & De Deyn, P. P. (2019). PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. *Epilepsy & behavior : E&B*, 95, 51-55. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.02.029>
- Velazco-Cercas, E., Beltran-Parrazal, L., Morgado-Valle, C., & López-Meraz, M.-L. (2020). Status Epilepticus Increases Cell Proliferation and Neurogenesis in the Developing Rat Cerebellum. *The Cerebellum*, 19(1), 48-57. <https://doi.org/10.1007/s12311-019-01078-6>
- Vezzani, A., French, J., Bartfai, T., & Baram, T. Z. (2011). The role of inflammation in epilepsy. *Nature Reviews. Neurology*, 7(1), 31-40. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2010.178>
- Yang, Y., Chen, L., Zhang, N., Zhao, Y., Che, H., Wang, Y., Zhang, T., & Wen, M. (2023). DHA and EPA Alleviate Epileptic Depression in PTZ-Treated Young Mice Model by Inhibiting Neuroinflammation through Regulating Microglial M2 Polarization and Improving Mitochondrial Metabolism. *Antioxidants*, 12(12), 2079. <https://doi.org/10.3390/antiox12122079>
- White, A., Williams, P. A., Hellier, J. L., Clark, S., Dudek, F. E., & Staley, K. J. (2010). EEG spike activity precedes epilepsy after kainate-induced status epilepticus. *Epilepsia*, 51(3), 371-383. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02339.x>
- Yang, H., Shan, W., Zhu, F., Yu, T., Fan, J., Guo, A., Li, F., Yang, X., & Wang, Q. (2019). C-Fos mapping and EEG characteristics of multiple mice brain regions in pentylentetrazol-induced seizure mice model. *Neurological research*, 41(8), 749-761. <https://doi.org/10.1080/01616412.2019.1610839>
- Zhu, X., Dong, J., Shen, K., Bai, Y., Chao, J., & Yao, H. (2016). Neuronal nitric oxide synthase contributes to pentylentetrazole-kindling-induced hippocampal neurogenesis. *Brain Research Bulletin*, 121, 138-147. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.01.010>