

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

“Efecto neuroprotector de la *Magnolia officinalis* sobre la epileptogénesis en un modelo de *Status epilepticus* recurrente en ratas inmaduras.”

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

TESIS

Para obtención del grado de

Doctor en Ciencias Biológicas y de la Salud

PRESENTA

M. en C. Angélica Vega García

Comité tutorial:

Codirector interno: Dra. Adriana Margarita Morales Otal.

Codirector externo: Dra. Sandra Adela Orozco Suárez.

Asesor externo: Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta.

Ciudad de México, julio 3 del 2020.

**“El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Universidad Autónoma Metropolitana
pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del
CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo
Consejo, con el convenio PFP-20-93”.**



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 17 de noviembre de 2020

Comisión Académica
Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud
P r e s e n t e

El (La) que suscribe Angélica Vega García alumno/a con número de matrícula 2141801445, del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación "Efecto neuroprotector de la *Magnolia officinalis* sobre la epileptogénesis en un modelo de Status epilepticus recurrente en ratas inmaduras", a desarrollar en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional siglo XXI, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En grado de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM, Unidad Iztapalapa, de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.

Angélica Vega García

Nombre completo y firma autógrafa

Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis. El documento original será conservado por la Coordinación del Posgrado.

UNIDAD CUAJIMALPA
Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe, Cuajimalpa de Morelos,
C.P. 05300, Cd. México
55 5814 6530

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UNIDAD IZTAPALAPA
Av. San Rafael Atlixco N0 186,
Col. Vicentina, Iztapalapa, C.P. 09340,
Cd. México
55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA
Av. De las Garzas 10
Col. El Panteón, C.P. 52005 Lerma de
Villada, Méx.
72 8282 7002 ext. 2002

correo-e: doctocb@correo.xoc.uam.mx

UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. del Hueso 1000,
Col. Villa Quietud, Coyoacán, C.P.
04960, Cd. México
55 5483 7000 ext. 7504 y 3185



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Ciudad de México, a 17 de noviembre de 2020

El (La) que suscribe Angélica Vega García, alumno/a del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, y autor/a de la tesis titulada "Efecto neuroprotector de la Magnolia officinalis sobre la epileptogénesis en un modelo de Status epilepticus recurrente en ratas inmaduras",

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante mi Jurado el 15 de Julio del 2020, para la obtención del grado de doctor/a en Ciencias Biológicas y de la Salud, es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales de material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis no he reproducido párrafos completos, ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México, el 17 de noviembre del 2020.



Angélica Vega García

Nombre completo y firma autógrafa

Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis. El documento original será conservado por la Coordinación del Posgrado.

UNIDAD CUAJIMALPA
Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe, Cuajimalpa de Morelos,
C.P. 05300, Cd. México
55 5814 6530

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UNIDAD IZTAPALAPA
Av. San Rafael Atlixco N0 186,
Col. Vicentina, Iztapalapa, C.P. 09340,
Cd. México
55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA
Av. De las Garzas 10
Col. El Panteón, C.P. 52005 Lerma de
Villada, Méx.
72 8282 7002 ext. 2002

correo-e: doctocb@correo.xoc.uam.mx

UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. del Hueso 1000,
Col. Villa Quietud, Coyoacán, C.P.
04960, Cd. México
55 5483 7000 ext. 7504 y 3185

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

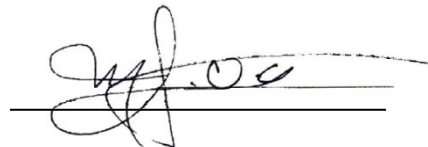
M. en C. Angélica Vega García.

El día 3 de julio del 2020.

JURADO

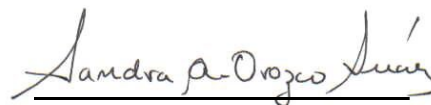
Presidenta: Dra. Adriana Margarita Morales Otal.

Profesor titular "C". Laboratorio de Neurohistología y Conducta del Área de Biología de la Reproducción. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.



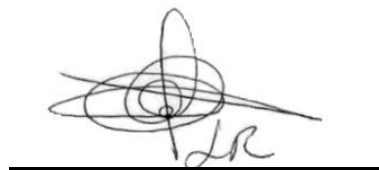
Secretaria: Dra. Sandra Adela Orozco Suárez.

Investigador Titular "B". Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas (UIMEN). Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda", Centro Médico Nacional siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social



Vocal: Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta.

Investigador titular "3E" Departamento de Farmacobiología. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, CINVESTAV, Sede Sur.



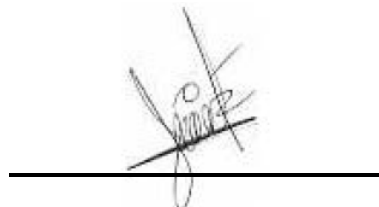
Vocal: Dra. Hermelinda Salgado Ceballos.

Investigador Titular "B". Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas (UIMEN). Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda", Centro Médico Nacional siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social.



Vocal: Dra. Iris Angélica Feria Romero.

Investigador Asociado "B". Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas (UIMEN). Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda", Centro Médico Nacional siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social.





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

Fecha : 14/07/2020
Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE DISERTACIÓN PÚBLICA de DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD de la alumna ANGÉLICA VEGA GARCÍA, matrícula 2141801445, quien cumplió con los 300 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio, 60 créditos de TRABAJO ACEPTADO PARA SU PUBLICACION SOBRE LA MISMA TESIS y 30 créditos de PREEXAMEN DOCTORAL. Con fecha quince de julio del 2020 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

Efecto neuroprotector de la Magnolia Offcinalis sobre la epileptogénesis en un modelo de Status epilepticus recurrente en ratas inmaduras.

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 90 créditos y el programa consta de 360 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobar

JURADO

Presidenta

DRA. ADRIANA MARGARITA MORALES OTAL

Secretaria

DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ

Vocal

DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS

Vocal

DRA. IRIS ANGELICA FERIA ROMERO

Vocal

DRA. LUISA LILIA ROCHA ARRIETA

AGRADECIMIENTOS.

- Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca de doctorado con número de registro 14801480/ CVU 419352 durante el período 2014-2017.
- Este proyecto fue realizado con fondos de la Fundación de Investigación en Salud IMSS [Número de registro: FIS/IMSS/ PROT/G12/1124] y Beca de movilidad internacional IMSS para estancia corta de investigación en el Departamento de Epileptología y Desarrollo del Instituto de Fisiología de la Academia de Ciencias Checas. Praga, República Checa, bajo la supervisión de la Dra. Hana Kubova. Jefa del departamento de Epileptología del desarrollo.
- A la Unidad de Investigación en Enfermedades Neurológicas (UIMEN) del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda”, Centro Médico Nacional siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Laboratorio 8 del Departamento de Farmacobiología. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, CINVESTAV, Sede Sur.
- International Brain Research Organization. IBRO-LARC. Estancia corta en investigación Referencia: No. ENR0139437. En el Departamento de Fisiología de la Universidad Federal de Sao Paulo (UNIFESP), bajo la supervisión del Dr. Ricardo Arida. Investigador del Programa de Neurociencias y Neurología.
- Laboratorio de laboratorio de Neurohistología y Conducta del Departamento de Biología de la Reproducción. Área de Neurociencias, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Centro de Restauración Neurológica de la Habana, Cuba. Área de Neurociencia del CIREN.
- Laboratorio sensorial, del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.

Un agradecimiento muy especial...

Para la Dra. Sandra Orozco Suárez, quien siempre ha creído en mí y de forma dedicada, paciente, incondicional, bondadosa y humana ha dirigido mis pasos en el camino de la ciencia.

Para la Dra. Luisa Rocha Arrieta, por ayudarme a descubrir y superar los límites de mi potencial académico, por enseñarme el valor de la disciplina y fuerza de voluntad.

Para la Dra. Adriana Morales Otal, por mostrarme que mientras más fuertes sean tus pruebas, más grandes serán tus victorias.

Para el Dr. Israel Grijalva, la Dra. Iris Feria Romero, la Dra. Hermelinda Salgado Ceballos y la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán por su apoyo, confianza, amistad y enseñanzas.

A los Doctores Christian Guerra, Julia Segura, Lourdes Lorigados, Lilia Morales, Juan Manuel Gallardo, Cecilia Zavala, Teresa Neri, Ruth Bustamante, Cesar Santana, Argelia Rosillo e Ivette Bañuelos por su amistad, apoyo y asesoría.

A la Histotecnóloga Carmen Baltazar, al Ingeniero José Luis Duran, al Biólogo Josué Hernández y al Prof. Gabriel Sandoval por su apoyo, dedicación y esfuerzo durante esas largas horas de trabajo.

A los compañeros de la UIMEN y del Laboratorio 8 del CINVESTAV sede sur: Jared, Maira, Ana, Janet, Alexia, Victor, Vinni, Stephy, Francia, José Luis, Christian, Ángeles, Cindy y Marisol por hacer de mi tiempo en el laboratorio único y enriquecedor.

¡Muchas gracias!

DEDICATORIA.

Para mi madre, mis abuelos Inés y Cui, mis hermanos Manuel y Daniela, mis tíos Paty, Paco, Ale, Victor, Reinols, por ser mi apoyo incondicional, por soñar, disfrutar, sufrir, luchar y trabajar a la par conmigo, por enseñarme a nunca rendirme, a disfrutar las victorias y a levantarme y aprender de las derrotas.

A mi bella familia y amigos por siempre acompañarme.

*En la noche que me envuelve,
negra, como un pozo insondable,
doy gracias al Dios que fuere
por mi alma inconquistable.*

*En las garras de las circunstancias
no he gemido ni he llorado,
bajo los golpes del destino,
mi cabeza ensangrentada jamás se ha postrado.*

*Más allá de este lugar de ira y llantos
acecha la oscuridad con su horror,
y sin embargo, la amenaza de los años me allá,
y me hallará sin temor.*

*Ya no importa cuán estrecho haya sido el camino,
ni cuantos castigos lleve a mi espalda:
soy el amo de mi destino,
soy el capitán de mi alma.*



INVICTUS

William Ernest Henley.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Definición <i>Status epilepticus</i>	4
2.2. Incidencia del <i>Status epilepticus</i> en el periodo inmaduro	5
2.3. Definición de epilepsia	5
3.- MARCO TEÓRICO.....	7
3.1. El cerebro inmaduro.....	7
3.1.1. Participación de citocinas en el neurodesarrollo postnatal.....	11
3.2. Epileptogénesis en el cerebro inmaduro.....	16
3.2.1. Vía de señalización proinflamatoria IL1-R/TLRs en la epileptogénesis.....	27
3.3. Fármacos antiinflamatorios empleados en la clínica y efectos a nivel experimental en modelos de <i>Status epilepticus</i>	32
3.3.1. Efectos secundarios de los antiinflamatorios no esteroideos y antiinflamatorios selectivos de Cox-2.....	34
3.4. <i>Magnolia officinalis</i>	35
3.4.1. Efecto antiinflamatorio de la <i>Magnolia officinalis</i>	37

3.4.2. Efectos depresor, analgésico y anticonvulsivo de <i>Magnolia officinalis</i> sobre el SNC.....	38
3.4.3. Farmacocinética del honokiol y magnolol principales activos de la <i>Magnolia officinalis</i>	40
3.4.4. Mutagenocidad y genotoxicidad del honokiol y magnolol componentes de la <i>Magnolia officinalis</i>	42
3.5. Modelo de <i>Status epilepticus</i> inducido por ácido kaínico en ratas inmaduras.....	43
3.5.1. Descripción de la conducta motora del <i>Status epilepticus</i> inducido por ácido kaínico en ratas inmaduras.....	46
4. JUSTIFICACIÓN.....	48
5. HIPÓTESIS.....	49
6. OBJETIVO GENERAL.....	50
6.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	50
7. METODOLOGÍA.....	52
7.1. Diseño experimental.....	52
7.1.1. Tipo de estudio.....	52
7.1.2. Universo de estudio.....	52
7.1.3. Criterios de inclusión.....	52
7.1.4. Criterios de exclusión.....	52
7.1.5. Variables independientes.....	52
7.1.6. Variables dependientes.....	53

7.2. Animales de experimentación.....	53
7.2.1. Inducción y manejo del modelo de <i>Status epilepticus</i> recurrente.....	54
7.2.2. Escala de evaluación de la conducta motora en ratas inmaduras.....	56
7.2.3. Tratamientos control y experimental post modelo de <i>Status epilepticus</i> recurrente.....	57
7.3. Técnicas de análisis.....	58
7.3.1. Western blot	58
7.3.2. Análisis por inmunohistoquímica.....	61
7.3.3. Método de conteo fraccionario de West.....	62
7.3.4 Técnica de microcirugía para implante de electrodo bipolar en CA1 de hipocampo ventral.....	63
7.3.5. Determinación del umbral post descarga (UPD).....	65
7.3.5.1. Escala de evaluación motora de Racine modificada 1972.....	66
7.3.6. Evaluación de la actividad electroencefalográfica (EEG).....	67
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	68
9. RESULTADOS POR OBJETIVOS PARTICULARES.....	70
10. DISCUSIÓN.....	113
11. CONCLUSIÓN.....	123
12. PERSPECTIVAS.....	124
13. BIBLIOGRAFÍA.....	125

14. ARTÍCULO CIENTÍFICO: “Magnolia officinalis reduces the long-term effects of the Status epilepticus induced by kainic acid in immature rats. Brain Res Bull. 2019; 149:156-167. doi: 10.1016/j.brainresbull.2019.04.003.....	169
--	------------

ÍDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Períodos críticos de neurodesarrollo postnatal.....	15
Fig. 2. Epileptogénesis en el cerebro inmaduro.....	27
Fig. 3. Flor de la <i>Magnolia officinalis</i>	36
Fig. 4. Ácido kaínico.....	44
Fig. 5. Ratas de 10 días PN tratadas con AK que muestran las fases de la conducta motora del <i>Status epilepticus</i>	47
Fig. 6. Modelo de <i>Status epilepticus</i> recurrente en ratas inmaduras.....	55
Fig. 7. Técnica de microcirugía empleada para realizar el implante de un electrodo bipolar en hipocampo ventral.....	64
Fig. 8. Determinación del umbral post descarga (UPD).....	65
Fig. 9. Escala de modificada de Racine.....	66
Fig. 10. Evaluación el efecto antiinflamatorio de la MO post modelo de <i>Status epilepticus</i> recurrente.....	69
Fig. 11. Expresión de las proteínas proinflamatorias IL1- β , Cox-2 en hipocampo.....	73
Fig. 12. Expresión de las proteínas proinflamatorias iNOS y NF κ - β en hipocampo.....	74
Fig. 13. Expresión de las proteínas proinflamatorias TNF- β en hipocampo.....	75
Fig. 14. Cuantificación de la preservación neuronal y gliosis en hipocampo al día 30 PN.....	76
Fig. 15. CA1 de hipocampo dorsal al día 30 PN.....	82

Fig. 16. CA3 de hipocampo dorsal al día 30 PN.....	83
Fig. 17. Giro dentado hipocampo dorsal al día 30 PN.....	84
Fig. 18. Hilus de hipocampo dorsal al día 30 PN	85
Fig. 19. CA1 de hipocampo ventral al día 30 PN	86
Fig. 20. CA3 de hipocampo ventral al día 30 PN.....	87
Fig. 21. Giro dentado de hipocampo ventral al día 30 PN.....	88
Fig. 22. Hilus de hipocampo ventral al día 30 PN.....	89
Fig. 23. Evaluación de la susceptibilidad convulsiva y actividad epileptiforme al día 90 PN....	90
Fig. 24. Determinación del umbral post descarga (UPD).....	91
Fig. 25. Evaluación de la conducta motora por medio de la escala de Racine.....	92
Fig. 26. Espectros de poder relativo de diferentes frecuencias obtenidas de registros en condiciones basales.....	94
Fig. 27. Análisis espectral y registro por electroencefalograma (EEG) del período basal.....	95
Fig. 28. Espectros de poder relativo de las frecuencias obtenidas posterior a la determinación del umbral post descarga (UPD).....	96
Fig. 29. Análisis espectral y registro por electroencefalograma EEG del período post umbral post descarga (UPD).....	97
Fig. 30. Cuantificación de la preservación neuronal y evaluación cualitativa de gliosis en hipocampo al día 90 PN.....	98
Fig. 31. CA1 de hipocampo dorsal al día 90 PN	103
Fig. 32. CA3 hipocampo dorsal al día 90 PN	104
Fig. 33. Giro dentado del hipocampo dorsal al día 90 PN	105

Fig. 34. Hilus de hipocampo dorsal al día 90 PN	106
Fig. 35. CA1 de hipocampo ventral al día 90 PN.....	107
Fig. 36. CA3 de hipocampo ventral al día 90 PN.....	108
Fig. 37. Giro dentado hipocampo ventral al día 90 PN.....	109
Fig. 38. Hilus de hipocampo ventral al día 90 PN.....	110
Fig. 39. Efecto antiinflamatorio y neuroprotector del tratamiento con MO al día 30 PN.....	116
Fig. 40. Efecto neuroprotector del tratamiento con MO sobre la susceptibilidad convulsiva al día 90 PN.....	121

RESUMEN.

El *Status epilepticus* es la emergencia médica más frecuente en neurología pediátrica, la neuroinflamación inducida por el *Status epilepticus* en un cerebro inmaduro, incrementa la vulnerabilidad desarrollar epilepsia en etapas posteriores. **OBJETIVO:** Evaluar el efecto antiinflamatorio y neuroprotector a corto y largo plazo de la *Magnolia officinalis* (MO) sobre el *Status epilepticus* recurrente en ratas inmaduras. **METODOLOGÍA:** Se utilizaron ratas Sprague Dawley de 10 días de edad postnatal (PN), las cuales desarrollaron *Status epilepticus* inducido por ácido kaínico (AK) 3 mg/kg i.p. cada 24 h durante cinco días (10 al 14 PN) y un grupo SHAM que recibió solución salina i.p. A partir del día 14 PN, post modelo de *Status epilepticus* recurrente, se formaron dos grupos control: SHAM, AK que recibieron solución salina v.o. y dos grupos experimentales que recibieron 300 mg/kg v.o de MO (AK-MO) y 20 mg/kg v.o de Celecoxib (AK-Clbx) respectivamente. Se realizaron los siguientes cortes de tiempo: a las 6 y 24 h post tratamiento con una dosis única de MO y Clbx, se evaluó el efecto antiinflamatorio, por medio de la cuantificación las proteínas interleucina (IL) 1- β , ciclooxigenasa (Cox)-2, óxido nítrico inducible (iNOS), factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF κ β) y factor de necrosis tumoral (TNF)- α en tejido de hipocampo, por la técnica de Western blot. Al día 30 PN se evaluó el efecto neuroprotector a corto plazo, de una administración subcrónica durante 10 días de MO (grupo AK-MO) y Clbx (grupo AK-Clbx), se evaluó la preservación neuronal por inmunohistoquímica de Neun N y gliosis por GFAP en los sub campos CA1, CA3, GD e hilus del hipocampo dorsal y ventral. Al día 90 PN (76 días post modelo de *Status epilepticus* recurrente) se evaluó la susceptibilidad convulsiva por medio de la determinación del umbral post descarga (UPD) y su correspondiente conducta motora evaluada por la escala de Racine. Se realizó un registro por electroencefalograma (EEG) en el período basal y post UPD. Se realizó análisis espectral por medio de transformadas de Fourier, para lo cual, los valores de potencia correspondientes a las diferentes bandas analizadas fueron contra el valor de poder máximo de cada banda analizada. Posteriormente, se cuantificó el número de células inmunorreactivas a Neun N y de forma cualitativa la expresión de gliosis marcada por GFAP, en los sub campos CA1, CA3, giro dentado (GD) e hilus de hipocampo dorsal y ventral. **RESULTADOS:** El efecto antiinflamatorio, en los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron una disminución en la expresión de IL1- β $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$ a las 6 h y 24 h, Cox-2 $**p < 0.013$ y $***p < 0.001$ a las 6 h y $*p < 0.013$ y $**p < 0.01$ a las 24 h post tratamiento, iNOS $**p < 0.01$ a las 6 h, con un incremento a las 24 h post tratamiento mostrando una diferencia significativa $****p < 0.0001$ en comparación con el grupo SHAM. Por otra parte, en NF κ - β solo el grupo

AK-Clbx a las 24 h post tratamiento mantuvo esta disminución $***p < 0.001$ en comparación con los grupos AK y AK-MO. En la expresión de TNF- α no se observaron diferencias significativas a las 6 h en comparación con el grupo AK, no obstante, a las 24 h post tratamiento, los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron menor expresión $**p < 0.02$ y $****p < 0.0001$ en comparación con el grupo AK. **El efecto neuroprotector al día 30 PN**, en hipocampo dorsal el grupo AK-MO mostró mayor número de células inmunorreactivas a Neun N en CA1 y CA3 $**p < 0.01$ y $**p < 0.031$, similar a lo observado en el grupo AK-Clbx con una diferencia significativa $**p < 0.02$ en CA3, en comparación con el grupo AK. En la cuantificación de gliosis, solo el grupo AK-MO mostró en CA3 e hilus una disminución de células inmunorreactivas a GFAP $**p < 0.0058$ y $**p < 0.01$ respectivamente, en comparación con el grupo AK. En hipocampo ventral, los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron mayor preservación neuronal en comparación con el AK en CA1 $***p < 0.001$, CA3 $****p < 0.0001$ y GD $***p < 0.001$, de igual forma los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron una disminución de gliosis en CA1 $**p < 0.001$ y $*p < 0.02$ y en GD $*p < 0.01$ respectivamente, en comparación con el grupo AK. **En la evaluación de susceptibilidad convulsiva por medio de la determinación de UPD al día 90 PN:** los animales de los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron un UPD similar al grupo AK, ambos mostraron una diferencia significativa menor en comparación con el grupo SHAM, $****P < 0.0025$, $****P < 0.0001$ y $****P < 0.0049$ respectivamente, además de un porcentaje de cambio del 56% en la intensidad de corriente (μA) para generar una post descarga, entre los grupos AK y SHAM, 74.7% entre AK-MO y SHAM, 49.59% entre AK-Clbx y SHAM. En la evaluación de la conducta motora, se observó que el 100% de las ratas pertenecientes a los grupos SHAM, AK-MO y AK-Clbx presentaron únicamente una Fase I en escala de Racine en comparación con el grupo AK donde el 70% de las ratas presentaron actividad convulsiva de tipo tónico clónica secundariamente generalizada característica de la Fase V en escala de Racine. El análisis por EEG en condiciones basales muestra actividad homogénea de las bandas 0.1-4 Hz delta, 4-8 Hz teta, 8-13 Hz alfa, 13-30 Hz beta y 30-90 Hz gamma, en los grupos control y experimental, posterior a la determinación de UPD, los grupos SHAM, AK-MO y AK-Clbx mostraron una disminución en la actividad de la banda 30-90 Hz gamma, el grupo AK mantuvo una actividad de 4-8 Hz teta, 8-13 Hz alfa, con una disminución en la banda 30-90 Hz gamma. **En la evaluación del efecto neuroprotector a largo plazo (76 días post Status epilepticus recurrente (90PN)),** en hipocampo dorsal, los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron mayor preservación neuronal en CA1 $****p < 0.0001$ y $***p < 0.001$, CA3 $****p < 0.0001$ e hilus $****p < 0.0001$ en comparación con el grupo AK. No obstante, en hipocampo ventral se observó mayor preservación neuronal solo en el GD e hilus de los grupos AK-MO y AK-Clbx mostrando una diferencia significativa $***p < 0.001$ y $*p < 0.01$ GD y $***p < 0.001$ y $****p < 0.0001$ hilus, respectivamente, en comparación con el grupo AK. Adicionalmente, los grupos AK-MO y AK-

Clbx mostraron de forma cualitativa en hipocampo dorsal y ventral menor expresión de gliosis en CA1 y CA3 en comparación con el grupo AK, donde se observó un incremento de células inmunorreactivas GFAP en CA1, CA3, GD e hilus, mostrando cambios en el tamaño y la forma del núcleo, así como un aumento en las extensiones de astrocitos, que indica la presencia de gliosis reactiva. **CONCLUSIÓN:** El tratamiento con MO mostró un efecto antiinflamatorio similar al Clbx, observando un efecto neuroprotector en hipocampo a corto y largo plazo, que mostró inhibición de la propagación de la actividad convulsiva, lo que postula a la MO como una alternativa de tratamiento sobre la epileptogénesis.

Palabras clave: ácido kaínico, *Status epilepticus*, neurodesarrollo, epileptogénesis, *Magnolia officinalis*, neuroinflamación

ABSTRACT

Status epilepticus is the most frequent medical emergency in pediatric neurology, the neuroinflammation induced by *Status epilepticus* in an immature brain, increases the vulnerability to develop epilepsy in later stages. **AIM:** To assess the short- and long-term anti-inflammatory and neuroprotective effect of *Magnolia officinalis* (MO) on recurrent *Status epilepticus* in immature rats. **METHOD:** Sprague Dawley rats 10 days postnatal (PN) were used, which ones developed kainic acid-induced *Status epilepticus* (KA 3 mg/ kg i.p.) every 24 h for five days (from 10 to 14 PN days) and SHAM group that received saline solution i.p. Starting on the 14th day, after establishing the recurrent *Status epilepticus* model, two control groups were formed: SHAM and AK that received saline v.o. and two experimental groups that received 300 mg/kg v.o of MO (KA-MO) and 20 mg/kg v.o of Celecoxib (KA-Clbx) respectively. The following time cuts were made: at 6 and 24 h post treatment with a single dose of MO and Clbx, the anti-inflammatory effect was evaluated, through of the quantification of interleukin (IL) 1- β , cyclooxygenase (Cox)-2, inducible nitric oxide (iNOS), nuclear factor enhancing kappa light chains of activated B cells (NF κ β) and tumor necrosis factor (TNF)- α proteins in hippocampal tissue, by the Western blot technique. At day 30 PN, the short-term neuroprotective effect was evaluated of a subchronic administration (10 days \times 24 h of MO and Clbx) in the KA-MO and KA-Clbx groups, neuronal immunohistochemistry and GFAP gliosis neuronal preservation was evaluated in the CA1, CA3, dentate gyrus (DG) and hilus subfields of the dorsal and ventral hippocampus. At day 90 PN (76 days post recurrent *Status epilepticus*), seizure susceptibility was assessed by determining the post-discharge threshold (ADT) and its corresponding motor behavior as assessed by the Racine scale. Electroencephalogram (EEG) recording was performed at baseline and post ADT. Spectral analysis was performed by means of Fourier transforms, for which, the power values corresponding to the different bands were against the maximum power value of each band analyzed. Subsequently, the number of Neun N immunoreactive cells and the qualitative expression of GFAP-labeled gliosis were quantified in the CA1, CA3, DG and hilus dorsal and ventral subfields. **RESULTS:** The anti-inflammatory effect, in the KA-MO and KA-Clbx groups they showed a decrease in the expression of IL1- β $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$ at 6 h and 24 h, Cox-2 $**p < 0.013$ and $***p < 0.001$ at 6 h and

$*p < 0.013$ and $**p < 0.01$ at 24 h post treatment, iNOS $**p < 0.01$ at 6 h, with an increase at 24 h post treatment showing a significant difference $****p < 0.0001$ as compared to the SHAM group. On the other hand, in NF κ - β only the KA-Clbx group at 24 h post treatment maintained this decrease $***p < 0.001$ in compared to the KA and KA-MO groups. In TNF- α expression, no significant differences were observed at 6 h compared to the KA group, however, at 24 h post treatment, the KA-MO and KA-Clbx groups showed lower expression $**p < 0.02$ and $****p < 0.0001$ compared to the KA group. **The neuroprotective effect on day 30 PN**, in the dorsal hippocampus, the KA-MO group, showed a greater number of cells immunoreactive to Neun N in CA1 and CA3 $**p < 0.01$ and $**p < 0.031$, similar to that observed in the KA-Clbx group with a significant difference $**p < 0.02$ in CA3, compared to the KA group. In gliosis quantification, only the KA-MO group showed a decrease in GFAP immunoreactive cells in CA3 and hilus $**p < 0.0058$ and $**p < 0.01$ respectively, compared to the KA group. In the ventral hippocampus, the KA-MO and KA-Clbx groups showed greater neuronal preservation compared to the KA in CA1 $***p < 0.001$, CA3 $****p < 0.0001$ and DG $***p < 0.001$, in the same way the groups, the KA-MO and KA-Clbx groups show a decrease in gliosis in CA1 $**p < 0.001$ and $*p < 0.02$ and DG $*p < 0.01$ respectively, compared to the KA group. **In the evaluation of seizure susceptibility by means of ADT determination at day 90 PN:** the animals of KA-MO and KA-Clbx groups showed a ADT similar to the KA, both showed a minor significant difference compared to the SHAM group, $****P < 0.0025$, $****P < 0.0001$ and $****P < 0.0049$ respectively, in addition to a 56% change in current intensity (μ A) to generate a post discharge between the KA and SHAM groups, 74.7% between KA-MO and SHAM and 49.59% between KA -Clbx and SHAM. In the evaluation of motor behavior, it was observed that 100% of the rats belonging to the SHAM, KA-MO and KA-Clbx groups presented only a Phase I on the Racine scale in compared to the KA group where 70% of rats shows secondary generalized clonic tonic-type seizure activity characteristic of Phase V on the Racine scale. The analysis by EEG in basal conditions shows homogeneous activity of the bands 0.1-4 Hz delta, 4-8 Hz theta, 8-13 Hz alpha, 13-30 Hz beta and 30-90 Hz gamma, in the control and experimental groups, after the determination of ADT, the SHAM, KA-MO and KA-Clbx groups showed a decrease in the activity of the 30-90 Hz gamma band, the KA group maintained an activity of 4-8 Hz theta, 8-13 Hz alpha, with a decrease in the 30-90 Hz gamma band. **In the**

evaluation of the long-term neuroprotective effect (76 days post recurrent *Status epilepticus* (90 PN)), in the dorsal hippocampus, the KA-MO and KA-Clbx groups showed greater neuronal preservation in CA1 **** $p < 0.0001$ and *** $p < 0.001$, CA3 **** $p < 0.0001$ and hilus **** $p < 0.0001$ in compared to the KA group. However, in the ventral hippocampus, greater neuronal preservation was observed only in the DG and hilus of the KA-MO and KA-Clbx groups, showing a significant difference *** $p < 0.001$ and * $p < 0.01$ DG and *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ hilus, compared to the KA group. Additionally, the KA-MO and KA-Clbx groups showed qualitatively lower dorsal and ventral hippocampus expression of gliosis in CA1 and CA3 in compared to the KA group, where an increase in GFAP immunoreactive cells was observed in CA1, CA3, GD and hilus, showing changes in the size and shape of the nucleus, as well as an increase in the extensions of astrocytes, indicating the presence of reactive gliosis. **CONCLUSION:** MO treatment showed an anti-inflammatory effect similar to Clbx, observing a neuroprotective effect in the hippocampus in the short and long term, which showed inhibition of the spread of seizure activity, which postulates MO as an alternative treatment on epileptogenesis.

Key Words: kainic acid, *Status epilepticus*, neurodevelopment, epileptogenesis, *Magnolia officinalis*, neuroinflammation.

ABREVIATURAS

- AA: ácido araquidónico.
- Ac: anticuerpos.
- ADN: ácido desoxirribonucleico.
- AINEs: Antiinflamatorio no esteroideos.
- AK: ácido kaínico.
- AMPArs: receptores alfa-amino-3-hidroxi-5metil 1-4 isoxazol propionato.
- AMPc: adenosín monofosfato cíclico.
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero.
- BHE: barrera hematoencefálica.
- Ca⁺²: calcio.
- Cl⁻: cloro.
- Cox-2: ciclooxigenasa-2.
- DE: desviación estándar.
- ELT: epilepsia del lóbulo temporal.
- EE: error estándar.
- kDa: kilo dalton.
- FLA2: fosfolipasa A2.
- Gprs: receptores acoplados a la proteína G.
- GABA: ácido-gamma-amino-butírico.
- GAD: glutamato descarboxilasa.
- GAP43: proteína asociada a crecimiento.
- GD: giro dentado.
- GE: gestación.
- GluRs: receptores a glutamato.
- GTP: receptores acoplados a la proteína G.
- HSP27, HSP70 y HSP72: proteínas de choque térmico de diferentes pesos moleculares (kDa).
- 4-HE: 4-hydroxynonenal.
- HMGB1: proteína 1 del grupo de alta movilidad.
- i.p: intra peritoneal.
- i.v: intravenosa.
- i.m: intra muscular.
- iGluRs: receptores ionotrópicos a glutamato.
- IL-1/TLRs: interleucina 1/ receptores Toll.

- IL-1 β : interleucina 1 beta.
- IDV: índice de densidad de valor integrado.
- IDV/V: índice de densidad de valor integrado/valor.
- iNOS: óxido nítrico inducible.
- JNK: quinasas c-Jun N-terminal.
- K⁺¹: potasio.
- KA1 y KA2: receptores a kainato.
- KCC2 y NKCC1: cotransportadores a cloro.
- KCl: cloruro de potasio.
- K₂HPO₄: fosfato de potasio dibásico.
- LPS: lipopolisacárido o endotoxina componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas.
- LTP: long-term potentiation.
- Li-Pilo: litio pilocarpina
- MAPK: quinasas activadas por mitógenos.
- MMP9: metaloproteasa 9 de la matriz endotelial.
- Mg⁺²: magnesio.
- mGluRs: receptores metabotrópicos de glutamato.
- Na⁺¹: sodio.
- NaCl: cloruro de sodio.
- Na₂HPO₄: fosfato de sodio dibásico.
- NADH: ubiquinona oxido reductasa.
- NF κ - β : factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
- 3NT: nitrotirosina 3.
- NK: células natural killer.
- NOAEL: índice de toxicidad que se determina en el proceso de "evaluación toxicológica", y a partir de él se deriva el resto de parámetros de toxicidad.
- nNOS: óxido nítrico sintetasa.
- ON: óxido nítrico.
- PBS: buffer de fosfatos.
- Proteína G: proteína fijadora de nucleótido de Guanina
- PGs: prostaglandinas.
- PKC: proteína cinasa C.
- PMN: polimorfonucleares.
- PN: postnatal.
- PGs: prostaglandinas.

- PGE2: prostanglandina E2.
- p38: MAP quinasa (MAPK), también llamada RK o CSBP (proteína de unión específica de citoquinina).
- IL-1R1: receptor 1 de la IL1- β .
- Kars: receptores a kaínato.
- NMDArs: receptores N-metil-D-aspartato.
- ROS: especies reactivas de oxígeno.
- RSN: especies reactivas de nitrógeno.
- SE: Status epilepticus.
- SDS: dodecil sulfato de sodio.
- SNC: sistema nervioso central.
- SNR: sustancia nigra reticulada.
- Src: tirosina cinasa.
- TGF- β : factor de crecimiento transformante beta.
- TLRs: receptores Toll.
- TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.
- v.o: vía oral.

1. INTRODUCCIÓN.

Durante los periodos del neurodesarrollo postnatal (PN), la excitabilidad neuronal mediada por el sistema glutamatérgico predomina en comparación con la actividad GABAérgica inhibitoria, con la finalidad de favorecer los procesos de crecimiento, plasticidad, sinaptogénesis y organización de redes neuronales esenciales para la etapa adulta (Plotkin y cols., 1997; Ben Ari y cols., 2002; 2006; Rakhade y cols., 2009), lo que vuelve al cerebro inmaduro altamente susceptible a desarrollar hiperexcitabilidad neuronal ante condiciones patológicas como hipertermia, hipoxia, trauma cráneo encefálico (TCE) o una condición neuroinflamatoria preexistente, que a su vez facilita el desarrollo de actividad convulsiva y el establecimiento de un *Status epilepticus* (Dube y cols., 2005; Sankar y cols., 2007; Ravizza y cols., 2006; Ravizza y cols., 2008; Suchomelova y cols., 2015).

El *Status epilepticus*, es la emergencia médica más frecuente en neurología pediátrica, especialmente durante los dos primeros años de vida. Se establece que un *Status epilepticus* presente en etapas tempranas del neurodesarrollo, incrementa la vulnerabilidad de estructuras como el hipocampo a desarrollar actividad convulsiva espontánea y progresión de una epilepsia en etapas posteriores o adultas (Rizzi y cols., 2003; Auvin y cols., 2007; Pitkänen y cols., 2015). El periodo comprendido entre el daño agudo generado por el *Status epilepticus* y el desarrollo de actividad convulsiva espontánea, se denomina epileptogénesis (Löscher y cols., 2010; Dudek y cols., 2012; Pitkanen and Engel Jr. y cols., 2014).

En este período, la participación de la respuesta neuroinflamatoria generada por los astrocitos y la microglía, activa la vía de la IL-1/TLRs, en respuesta a daño neuronal excitotóxico.

Lo que incrementa la expresión de proteínas proinflamatorias como la interleucina (IL)1- β y la ciclooxigenasa (Cox)-2. Estas proteínas proinflamatorias, a su vez promueven la generación de hiperexcitabilidad neuronal, asociada al aumento de la afinidad de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDArs), por la activación de la tirosina cinasa y fosforilación de la subunidad NR2A/B. Lo que incrementa el flujo de calcio (Ca^{+2}) intracelular y activación del óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), para la síntesis de óxido nítrico (ON), especies reactivas de oxígeno (ROS), prostaglandinas (PGs) y otras proteínas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α y el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF κ - β). Lo que, a su vez, disminuye el umbral convulsivo y genera un círculo vicioso de neuroinflamación, hiperexcitabilidad y muerte neuronal (Ravizza y cols., 2005;2008; Vezzani y cols., 2013; Iori y cols., 2017).

Por lo anterior, la vía de la IL1- β y Cox-2 se convierten en un potencial blanco terapéutico (Pencowa y cols., 2001; Terrone y cols., 2016; McElroy y cols., 2019). La familia de los Coxib, inhibidores selectivos de la Cox-2 han sido estudiados por su potencial aplicación como antiepiléptogénicos. Sin embargo, el uso de fármacos antiinflamatorios selectivos de la Cox-2, está contraindicado en niños, debido a sus efectos secundarios a nivel cardiovascular, gastrointestinal y renal (Katzung y Bertram y cols., 2007).

El extracto de *Magnolia officinalis* (MO), conocido como Hou pu, ha sido empleado en la medicina tradicional china, como remedio para desordenes gastrointestinales, gripe, ansiedad y alergias (Lee y cols., 2011). Actualmente, se sabe que el género de la *Magnolia* es rico en diversos activos biológicos, ya que, se han reportado cerca de 255 diferentes componentes, de los cuales destacan dos principales activos: el honokiol (3,'-Diallyl-2,2'-

dihydroxybiphenyl) y el magnolol (5,5'-Diallyl-2,2'-dihydroxybiphenyldiol), componentes bifenil-hidroxilados cuyo efecto sinérgico ha sido extensamente reportado como antiinflamatorio y antioxidante (Lin y cols., 2006; Shen y cols., 2007; Chang-Mu y cols., 2010; Lee y cols., 2013).

Estudios recientes han demostrado que, la MO posee efectos neuroprotectores (Hoi y cols., 2010), hepatoprotectores (Chang y cols., 2003), antiproliferativos celulares (Dikalov y cols., 2003) y anti metastásicos (Lee y cols., 2009). Su uso en modelos de excitotoxicidad neuronal *in vitro* y de isquemia cerebral en ratas, han mostrado su capacidad para modular la respuesta neuroinflamatoria sobre la producción de ON, iNOS, así como de las de proteínas proinflamatorias Cox-2, IL1- β , TNF- α y NF κ - β (Son y cols., 2000; Matsuda y cols., 2009; Zhang y cols., 2013).

2. ANTECEDENTES.

2.1. Definición de *Status epilepticus*.

El *Status epilepticus*, se define como una condición patológica caracterizada por la presencia de crisis epilépticas repetidas, las cuales pueden ser de tipo convulsivas (parciales o secundariamente generalizadas) o de tipo no convulsivas, con una duración mayor a los 30 min. Así mismo, pueden presentarse crisis convulsivas de forma discontinua, sin recuperación de la función normal entre crisis, durante un tiempo mayor a los 30 min (Lowenstein y cols., 1999; Neligan y cols., 2010; Cock y cols., 2015).

La liga internacional de lucha contra la epilepsia (ILAE), define como crisis convulsivas a la alteración temporal de la función cerebral, producto de descargas excesivas y anormales de grupos neuronales, que se originan por causas de tipo celular y molecular que generan un desequilibrio entre la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria (Fisher y cols., 2014). Las manifestaciones clínicas de una crisis convulsiva, pueden expresar alteraciones en el estado de alerta, en la función motora, en la percepción sensorial y en las funciones autonómicas (Dichter y cols., 2009; Fisher y cols., 2014). La semiología, pronóstico y respuesta farmacológica a menudo difieren según la edad y el tipo de daño epileptogénico generado (Nehlig y cols., 1999; Kubova y cols., 2012).

2.2. Incidencia del *Status epilepticus* en el periodo inmaduro.

Se considera al *Status epilepticus* como la emergencia clínica más frecuente en neurología pediátrica y factor etiológico importante, de la presencia de epilepsia en la infancia o en la etapa adulta (Löscher y cols., 2009; Pitkänen y cols., 2015). A nivel mundial, la incidencia del *Status epilepticus* en neonatos es de 50 a 100 casos por cada 100.000 recién nacidos vivos (Hauser y cols., 2009). Se estima que cada año cerca de 150.000 infantes en Estados Unidos y México, presentan un desorden convulsivo por primera vez; asociado a desordenes febriles, trauma craneoencefálico, infecciones de tipo viral, trastornos metabólicos, hipoxia y alteraciones de origen criptogénico (Sillanpää y cols., 2009; Rakhade y cols., 2009). La incidencia de la epilepsia en la edad de 0 a 14 años, es de 82 por cada 100.000 niños, el cual es significativamente mayor en comparación con la población adulta de 15 a 59 años. Donde se observa un promedio de 34.7 por cada 100.000 individuos (Kotsopoulos y cols., 2002), siendo mayor la incidencia reportada en países en desarrollo (Forsgren y cols., 2005; Kubova y cols., 2012).

2.3. Definición de epilepsia.

La epilepsia se define como un desorden cerebral caracterizado por la presencia espontánea, transitoria y sin causa aparente de signos y síntomas, producto de una actividad neuronal anormal, excesiva y sincrónica (Fisher y cols., 2014; Trinka y cols., 2015).

La epilepsia es el segundo trastorno neurológico más común, ya que afecta a más de 65 millones de personas en todo el mundo (Hauser y cols., 1993; Volpe y cols., 2008; Sánchez

y Jensen, 2001; Jensen y cols., 2009; Blumenfeld y cols., 2003), de los cuales, cerca del 40% tienen el antecedente de haber presentado un daño neuronal, como es el caso de un *Status epilepticus* en etapas tempranas de la infancia. (Kuvoba y cols., 2007; Orozco-Suárez y cols., 2007; Löscher y cols., 2009; Moreira y cols., 2011; Laurén y cols., 2013). Adicionalmente, se ha demostrado que, las características fenotípicas de la epilepsia, así como el tipo de actividad convulsiva y la sensibilidad al tratamiento, se relacionan tanto con el periodo inmaduro, en el cual se presentó el daño cerebral (Nehlig y cols., 1999; Kubova y cols., 2012), así como la presencia y duración de la respuesta neuroinflamatoria (Yuan-Hao Chen y cols., 2013). Por otra parte, se estima que los pacientes con epilepsia de inicio en la infancia, exhiben anormalidades significativas en los procesos de aprendizaje y memoria. Lo anterior se debe a que, la presencia de crisis epilépticas recurrentes en niños genera alteraciones en el desarrollo motor y cognitivo (Heida y cols., 2004; Galic y cols., 2008; Yuan-Hao Chen y cols., 2013).

3. MARCO TEORICO.

3.1. El cerebro inmaduro.

Los estudios neurofisiológicos, morfológicos y bioquímicos han permitido caracterizar el desarrollo postnatal del sistema nervioso central (SNC), estableciendo de forma secuencial periodos críticos del neurodesarrollo, que se definen como la fracción de tiempo, de rápido crecimiento cerebral, donde la actividad neuronal excitatoria es indispensable para los procesos de sinaptogénesis y plasticidad neuronal (Jensen y cols., 2009; Rakhade y cols., 2009). Estudios en roedores y su correlación con el neurodesarrollo en humanos, han reportado como parámetros de referencia de madurez PN, los siguientes periodos críticos de desarrollo: del día 0 al 7 PN en la rata, corresponde a un recién nacido prematuro. El día 7 al 10 PN de la rata, corresponde a un recién nacido humano a término. El periodo del día 10 al 14 PN en la rata, corresponde a los primeros 36 meses de vida del humano. El periodo del día 14 al día 21 PN en la rata, corresponde a un infante de 3 a 9 años de edad. El día 28 PN en la rata, corresponde al período prepuberal presente a los 10 a 12 años de edad. El día 35 PN en la rata, corresponde a la etapa adolescente y a partir del día 60 PN en la rata, es considerado como el periodo adulto en el humano (Ben Ari y cols., 2006; Kubova y cols., 2012; Auvin y cols., 2014).

En el cerebro inmaduro, el neurotransmisor glutamato, constituye la mayor parte de las sinapsis, de igual forma, los canales iónicos excitatorios y los transportadores a glutamato están expresados a niveles que promuevan la excitación neuronal. Adicionalmente, la neurotransmisión inhibitoria mediada por ácido-gamma-amino-butírico (GABA), sintetizado a

partir de la descarboxilación del glutamato por medio de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), se encuentra relativamente subdesarrollada en comparación con el cerebro adulto, donde GABA, es el principal neurotransmisor inhibitorio (Jensen y cols., 2009; Sánchez y cols., 2001).

Se ha reportado en roedores, que durante la primer semana de desarrollo PN, GABA participa en la neurotransmisión excitatoria, debido al incremento del cotransportador de K^+/Cl^- NKCC1, que incrementa el Cl^- intracelular y genera despolarización neuronal, activación de los canales de Ca^{+2} sensibles a voltaje tipo L (L-VSCC) y de los receptores NMDArs, lo que aumenta el flujo de Ca^{+2} intracelular, que favorece la activación de cascadas de señalización dirigidas a la actividad trófica intracelular, crecimiento neurítico, formación de redes neuronales y sinaptogénesis (Galanopoulou y cols., 2008b; Ben Ari y cols., 2002; 2014). No obstante lo anterior, a partir del día 8 PN, GABA comienza a ejercer su actividad inhibitoria, debido al incremento en la expresión del cotransportador KCC2, el cual disminuye los niveles de Cl^- intracelular favoreciendo la hiperpolarización neuronal y la actividad inhibitoria de GABA (Galanopoulou y cols., 2010; Ben Ari y cols., 2002; 2014).

En el periodo comprendido entre los 10 a los 14 días PN, periodo en el cual, los receptores a glutamato (GluRs) son regulados por la glía y los receptores ionotrópicos a glutamato (iGluRs), están ligados a canales iónicos que permiten el flujo de iones sodio (Na^+), potasio (K^+) y Ca^{+2} en diferente grado, según sea la subunidad del receptor. Los principales subtipos, son los NMDArs, los alfa-amino-3-hidroxi-5metil 1-4 isoxazol propionato (AMPArs) y los receptores a kainato (KArs) (Romjin y cols., 1991; Tyzio y cols., 1999; Benitez-Díaz y cols., 2003; Herlenius y cols., 2004; Jensen y cols., 2009).

Los NMDARs en la etapa adulta, se subdividen en NMDAR1 (NR1) en combinación con las subunidades NR2A, NR2B, NR2C, NR2D y NR3A. Durante la segunda semana de vida PN, los NMDARs se expresan de forma diferente en el cerebro, ya que contienen altos niveles de las subunidades NR2B y NR3A, que reducen la sensibilidad de los NMDARs a los iones magnesio (Mg^{+2}), lo que aumenta la activación del receptor e incrementa el flujo de Ca^{+2} intracelular, favoreciendo con ello la hiperexcitabilidad neuronal y la potenciación a largo plazo (Long-term potentiation (LTP)). Lo cual, en condiciones normales, favorece los procesos de plasticidad y sinaptogénesis implicados en la consolidación de la memoria y aprendizaje (Qu y cols., 2003; Ben-Ari y cols., 2002; 2014). No obstante lo anterior, bajo condiciones patológicas, la hiperexcitabilidad neuronal del cerebro inmaduro también puede facilitar el desarrollo de crisis convulsivas.

Los NMDARs, que se distribuyen en el cerebro inmaduro, principalmente en el hipocampo, se encuentran a nivel postsináptico en su mayoría; así mismo, algunos de ellos también están presentes a nivel presináptico y en los astrocitos (Lee y cols., 2010; Szczurowska y cols., 2013; Skowronska y cols., 2019). Estudios electrofisiológicos han demostrado que los NMDARs, en las neuronas piramidales del hipocampo inmaduro, están regulados por Ca^{+2} extracelular en lugar de Mg^{+2} , como es en el caso de las neuronas maduras. Así mismo, los NMDARs son siempre permeables a Ca^{+2} , por lo que, el incremento del flujo de Ca^{+2} intracelular es mayor, lo que en condiciones patológicas como un *Status epilepticus*, favorece el daño neuronal excitotóxico (Rakhade y cols., 2009; Szczurowska y cols., 2019).

Los AMPARs, son combinaciones de GluR1 y GluR2, GluR3 y GluR4 y los KARs son combinaciones heteroméricas de GluR5, GluR6, GluR7, KA1 y KA2. La permeabilidad de

iones Ca^{+2} de los AMPArs y KARs, dependen de la composición de la subunidad del receptor (Romjin y cols 1991; Tyzio y cols 1999; Jensen y cols., 2009). Cuando la expresión de GluR2 es relativamente baja o ausente, los AMPArs son permeables a Ca^{+2} . Mientras que, los KARs, tienen mayor permeabilidad a Ca^{+2} cuando las subunidades GluR5 y GluR6 están ausentes. Adicionalmente, los receptores metotrópicos a glutamato (mGluRs), están acoplados a la proteína G (GTP) y son mediadores de las respuestas sinápticas lentas (Jensen y cols., 2009; Ben Ari y cols., 2014).

La expresión de los AMPArs, es de vital importancia durante las etapas de desarrollo del SNC en el humano, ya que se ha reportado que estos receptores se encuentran involucrados en los procesos de neuroplasticidad, en la migración celular, en el crecimiento neurítico y en la sobrevivencia neuronal. Sin embargo, la sobre expresión de estos receptores, facilita el incremento del flujo de Ca^{+2} intracelular, lo que, en condiciones patológicas, como en el caso de un *Status epilepticus*, facilita el daño neuronal por excitotoxicidad mediado por el incremento de glutamato (Jensen y cols., 2009; Herlenius y cols., 2004).

Al igual que los receptores dependientes de ligandos, los canales iónicos dependientes de voltaje afectan la excitabilidad neuronal, y su expresión está regulada por el neurodesarrollo. Se ha observado en neuronas de tálamo de ratón neonato, que la liberación de los neurotransmisores glutamato y GABA, depende de los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje (Cav) de tipo N y tipo P / Q.51 y que esta función es asumida exclusivamente por los canales de tipo P / Q, que son formados por subunidades Cav 2.1. en la etapa adulta (Rakhade y cols., 2009).

Por otra parte, el cerebro inmaduro es vulnerable a sustancias y fármacos debido a la inmadurez de la unión neuro-endotelial, presente en la barrera hematoencefálica (BHE). En esta etapa del neurodesarrollo, el cerebro es más permeable a sustancias neurotóxicas y presenta una disminución en la expresión de transportadores encargados de retirar del parénquima cerebral proteínas como albumina, iones como Na^+ , Cl^- , Ca^{+2} y neurotransmisores como glutamato, que contribuyen a la hiperexcitabilidad neuronal y daño excitotóxico (Saunders y cols, 2018) (Fig. 1).

3.1.1. Participación de citocinas en el neurodesarrollo postnatal.

Las células gliales: la microglía, los astrocitos y los oligodendrocitos, desempeñan un papel importante durante el neurodesarrollo. Los oligodendrocitos, participan en el crecimiento y remielinización axonal. La microglía, es considerada como los macrófagos del SNC, cuya función es crítica para el neurodesarrollo normal, ya que participa en el mantenimiento de la homeostasis cerebral, mediante la fagocitosis de neuronas muertas, eliminación de células progenitoras excesivas, remoción de mielina residual durante la formación y expansión de redes neuronales. De la misma forma, los astrocitos y la microglía, son encargados de la vigilancia y modulación de la respuesta inmune, ya que son los principales productores de citocinas en el SNC (Chao y cols., 1995; Baud y cols., 2019).

Las citocinas (también denominadas citoquinas) son proteínas que regulan la función tanto de las células que las producen como de otros tipos de células que no las producen, son los agentes responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores

específicos de membrana. Así mismo, las citocinas ejercen funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento celular y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. Las citocinas son producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares (PMN), células endoteliales, células epiteliales y células del tejido conjuntivo. Según el tipo celular que las produzca se denominan linfocinas (linfocito), monocinas (monocitos, precursores de los macrófagos) o interleucinas (células hematopoyéticas) y su acción fundamental es la regulación de los mecanismos de la inflamación (Rothwell y Hopkins, 1995; Hopkins y Rothwell 1995).

Se ha reportado que, las citocinas pueden modular la actividad neuronal de forma directa, al promover la liberación de moléculas neuro activas de la glía y el endotelio (ON, glutamato, PGs y neurotrófinas) y de forma directa por medio de la activación de receptores neuronales en medula espinal y cerebro (Viviani y cols., 2003; Eid y cols., 2008; Vezzani y cols., 2015).

El SNC, es un sitio “inmunológicamente privilegiado”, donde las citocinas ejercen mecanismos neuromoduladores durante procesos de neurodesarrollo, ya que se expresan constitutivamente en el tejido cerebral sano para regular mecanismos homeostáticos como el sueño y activación de vías de señalización involucradas en la plasticidad neuronal y sinaptogénesis (Kubota y cols., 2002; Vitkovic y cols., 2000; Vezzani y cols., 2012).

Por lo anterior, se ha establecido la participación de las citocinas en el crecimiento neurítico, neurogénesis, sobrevivencia neuronal, poda sináptica, regulación de la fuerza de

transmisión sináptica, modulación de canales iónicos, NMDARs, AMPARs y Kars, así como su distribución en la membrana neuronal, durante el neurodesarrollo (Viviani y cols., 2003; Marin y Kipnis y cols., 2013; Vezzani y cols., 2015). No obstante lo anterior, las citocinas ejercen actividad proinflamatoria y antiinflamatorias durante el curso de una respuesta inmune. Sin embargo, muchas acciones de las citocinas son pleiotrópicas y dependen en gran medida del medio en el que se encuentren. Por lo cual, la sobreproducción de citocinas y su actividad prolongada, también se ha asociado a disfunción neuronal, desordenes psiquiátricos y enfermedades neurodegenerativas como la epilepsia (Devinsky y cols., 2013; Zhang y cols., 2014).

En mamíferos, los receptores de citocinas se encuentran en todo el SNC, pero en mayor concentración en el hipotálamo, hipocampo, cuerpo estriado, la amígdala, tálamo, plexo coroideo, bulbo olfatorio, cerebelo, tronco encefálico y médula espinal. Por otra parte, la expresión de citocinas dentro del cerebro inmaduro es significativamente mayor en comparación con el cerebro adulto, incluso en ausencia de una respuesta inmune ante un patógeno (Rothwell y Hopkins, 1995; Hopkins y Rothwell 1995).

Adicionalmente, los astrocitos y la microglía tienen un papel importante en la determinación de la organización estructural del cerebro inmaduro, en el cual la microglía mantiene una conformación ameboidea, que le permite participar activamente en la fagocitosis de restos celulares de células apoptóticas, así como en la inducción de apoptosis en otras células, durante los procesos de la formación de circuitos neuronales funcionales, que, a menudo, implica la “poda de sinapsis” o *pruning synaptic* (Bessis y cols., 2007; Stevens y cols., 2007). Durante este proceso C1q y el complemento 3 (C3), participan como proteínas activadoras de

la cascada del complemento del sistema inmune, localizándose en las sinapsis destinadas a la muerte programada durante el neurdesarrollo (Stevens y cols., 2007). El resultado de esta cascada, es la expresión de citoquinas y otras moléculas derivadas de la microglía, que participan en los procesos de neurogénesis, migración neuronal y gliosis. Además de la conformación de los circuitos neuronales durante la proliferación, diferenciación, maduración y poda sináptica (Deverman y Patterson, 2009; Garay y McAllister, 2010).

Aunado a lo anterior, se ha reportado el incremento en la expresión de citocinas, destacando la presencia de la IL-1 β . Esta molécula se expresa a niveles detectables dentro de la corteza desde el día 14 de gestación (GE), hasta el día 7 PN (Giulian y cols., 1988); Por el contrario, la IL-1 β mantiene un pico en su expresión del día 2 al 14 PN en el cerebelo, ya que su desarrollo comienza posterior al nacimiento (Giulian y cols., 1988). Así mismo tanto la IL-1 β como el TNF- α están presentes al inicio del desarrollo del cerebro de mamíferos, donde la expresión de TNF- α disminuye posterior al nacimiento e incrementa nuevamente durante los procesos de sinaptogénesis a partir del día 2 al 14 PN (Dziegielewska y cols., 2000ab). Se ha reportado que los niveles de IL-1 β , aumentan casi seis veces en el momento del nacimiento en el hipocampo, en comparación con la etapa adulta. De igual forma, la IL-6 se involucra en numerosos procesos del neurdesarrollo y desarrollo vascular prenatal (Fee y cols., 2002) y que a lo largo de este proceso aumenta su expresión en el estriado, hipocampo y corteza cerebral,

participando como factor neurotrófico (Fig. 1) (Gadient y Otten, 1994ab; Sominsky y cols., 2018; Araujo y cols., 2019).

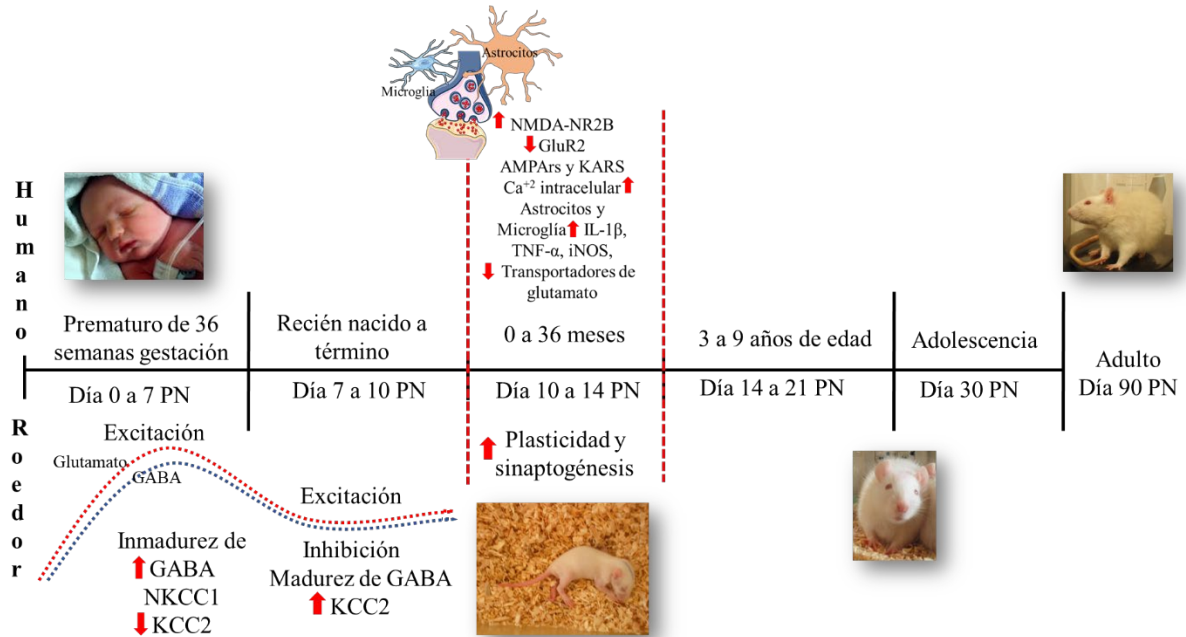


Fig. 1. Periodos críticos del neurodesarrollo postnatal. Se muestra la línea de tiempo del neurodesarrollo postnatal en roedores a partir del día 0 al día 90 PN en el roedor y su correlación con los periodos críticos del neurodesarrollo en el humano.

3.2.- Epileptogénesis en el cerebro inmaduro.

El término epileptogénesis o génesis de la epilepsia, se establece como una secuencia de eventos que convierten un circuito normal en un circuito hiperexcitable (Dudek y Staley 2012; Pitkanen y cols., 2015). La epileptogénesis se establece como el desarrollo y extensión de tejido capaz de generar crisis epilépticas espontáneas, que resultan en una condición epiléptica o en la progresión de una epilepsia establecida (Pitkanen y Engel Jr. 2014). El cual se inicia por un daño neuronal agudo, seguido de un “periodo latente”, el cual hace referencia al periodo de tiempo entre el daño neuronal y la aparición de la primera crisis convulsiva. Este periodo latente libre de crisis convulsivas, puede durar días, meses o años hasta la expresión de actividad convulsiva espontánea (Ben-Ari y cols., 2006; Pitkanen y cols., 2015; Löscher y cols., 2010; 2015). La epileptogénesis es un proceso continuo, dependiente de la frecuencia y severidad de las crisis convulsivas y puede continuar de forma progresiva a lo largo de la vida (Kadam y cols., 2010; Dudek y Staley 2012).

Diversos estudios en modelos experimentales y datos clínicos en humanos, establecen a la epileptogénesis como un proceso multifactorial, activado por un insulto inicial, usualmente acompañado por actividad convulsiva recurrente, como es el caso de un *Status epilepticus*, seguido de un periodo latente, el cual se describe como una cascada de eventos. Estudios en roedores, han reportado, que la duración del período de latente es de 2 a 12 semanas, observando cambios agudos, que pueden ocurrir en un lapso de tiempo de min a días. Donde, se ha reportado la inducción inmediata de los genes tempranos (IGTs): Fos, Jun, Egr4, Egr1, Homer 1, Nurr77 y Arc, debido a la intensa y repetida actividad sináptica observada durante la actividad convulsiva, la cual promueve el incremento del flujo de Ca^{+2} intracelular, por los NMDAr, lo

que a su vez, conduce a la activación de cascadas de cinasas y en la fosforilación de factores de transcripción como el AMP cíclico (AMPC), proteína de unión a CREB (cAMP-enlace de elementos de respuesta), para posteriormente trasladarse al núcleo donde inicia la transcripción génica (Herdegen y cols., 1998; Greenberg y cols., 2008). La sobreexpresión de IGTs puede modular de forma patológica la función sináptica, responsable de la disminución de umbral a la hiperexcitabilidad neuronal (Greer y cols., 2008; Rakhade y cols., 2009).

Se ha reportado que, la inducción en la síntesis del ARNm y la sobreexpresión de las proteínas c-Fos y c-Jun en las regiones CA1, CA3 y giro dentado (GD) del hipocampo, se presenta a las 3 a 5 h posterior al daño generado por un *Status epilepticus* inducido por ácido kaínico (AK) (Pozas y cols., 1997; Lukasiuk y cols., 2006), la expresión de c-Fos decrece rápidamente en otras estructuras como la corteza cerebral, pero permanece incrementada en el hipocampo y se ha asociado con la muerte neuronal por el daño excitotóxico. Por su parte, la expresión de c-Jun en el GD se observa 24 h después de la actividad convulsiva, su expresión se considera como marcador de la muerte celular retardada (Lukasiuk y cols., 2006).

No obstante, también se ha reportado que la expresión temprana de c-Jun, favorece la dimerización entre c-Fos y c-Jun para formar el factor de transcripción AP-1, el cual, activa la transcripción de genes implicados en procesos relacionados con la proliferación y diferenciación dirigidos a la reparación del daño celular (Schreiber 1993; Pozas y cols., 1997; Parent y cols., 2002).

De la misma forma, el incremento del flujo de Ca^{+2} intracelular, durante el *Status epilepticus*, altera de forma inmediata mecanismos de eficiencia sináptica, incremento de la

densidad postsináptica, aumento de las espinas dendríticas, agrupación de los NMDARs y AMPARs e incremento de la síntesis de glutamato (Haglid y cols., 1994; Sánchez y cols., 2005). Así mismo, la activación de fosfatasa y quinasas, alteran la actividad de los canales iónicos (proteínas de membrana que forman poros que permiten la entrada y salida de iones Cl^- , Na^+/K^+ , para el establecimiento de potenciales de acción) y su función sobre la unión del neurotransmisor con su receptor (Bordey y cols., 1998; Bourne y cols., 2008; Wei y cols., 2017). Por otra parte, la activación de la calcineurina (PPP3C o serina-treonina proteína fosfatasa 2B), enzima dependiente del incremento de Ca^{+2} citoplasmático que activa a la calcio-calmodulina-fosfatasa, durante la intensa actividad convulsiva, promueve la desfosforilación y subsecuente endocitosis de los GABA_A , lo que reduce el potencial inhibitorio y la pérdida paulatina de redes inhibitorias GABA_A érgicas (Kurz y cols., 2001; Blair y cols., 2004; Rakhade y cols., 2008).

En el cerebro inmaduro la activación de la calcineurina, incrementa la fosforilación de los canales iónicos Kv2.1 (también descritos como KCNB1), lo que promueve su internalización en la membrana post sináptica, permitiendo la despolarización neuronal prolongada (Kurz y cols., 2001; Rakhade y cols., 2008). La actividad de la proteína cinasa C, dependiente de la proteína cinasa tipo II y de la calcio-calmodulina-fosfatasa, se incrementan en minutos posterior al *Status epilepticus*, en ratas inmaduras, lo que permite el incremento de la fosforilación de la serina 831 en el GluR1 y la serina 880 en el GluR2. Lo anterior, promueve la endocitosis del GluR2 e incrementa la permeabilidad a Ca^{+2} en los AMPARs, que genera un incremento de la susceptibilidad convulsiva en etapas posteriores o adultas (Rice y cols., 1998; Rakhade y cols., 2008).

Adicionalmente, se ha reportado que la activación de los astrocitos, inmediato al daño por un *Status epilepticus*, incrementa las concentraciones extracelulares de K^+ , lo que a su vez facilita la hiperexcitabilidad neuronal continua. De forma similar, se ha reportado la sobreexpresión de los canales de Na^+ en hipocampo, lo que contribuye a la generación de actividad epileptiforme y muerte neuronal, siendo un factor desencadenante de epileptogénesis (Jensen y cols., 1994; Jabs y cols., 1997; O'Connor y cols., 1998).

Los cambios del periodo subagudo, se establecen de horas a días post *Status epilepticus*, observando el rápido incremento de factores neurotróficos, principalmente del factor de crecimiento de nervioso (NGF) y del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Los cuales junto con la tropomiosina cinasa (Trk), alteran la modulación de la maduración del cotransportador KCC2, que promueven la actividad inhibitoria mediada por GABA, principalmente en las células granulares del GD. Cabe mencionar que, durante el neurodesarrollo postnatal, estos factores neurotróficos mantienen niveles altos en comparación con el cerebro adulto, ya que son de suma importancia para los procesos de plasticidad y sinaptogénesis (Rivera y cols., 2005).

Por otra parte, se ha reportado, la sobre expresión en neuronas del hipocampo de las proteínas de choque térmico HSP27, HSP70 y HSP72 cuya función es específica de su localización (Schreiber y cola., 1993). La expresión de HSP70 y HSP72, tiene como función el prevenir el plegamiento anormal de proteínas de nueva síntesis, en las poblaciones neuronales vulnerables al daño excitotóxico, durante las dos primeras semanas post *Status epilepticus*. Estas proteínas se transportan por el árbol dendrítico y hacia las zonas más distales a lo largo de los axones, donde la HSP70 y la HSP72 ejercen una función neuroprotectora, aunque, difícilmente

consiguen evitar la muerte neuronal por excitotoxicidad, debido al incremento de su contraparte HSP27. Así mismo la expresión extracelular o membranal de HSP70 y HSP72 activan una respuesta neuroinflamatoria al ser ligandos de los receptores tipo Toll, específicamente del TLR4 (Planas y cols 1997; Anguelova y cols., 2000; Valentim y cols., 2001; Wei y cols. 2017; Gualtieri y cols., 2019).

Así mismo, esta respuesta neuroinflamatoria al daño excitotóxico, es activada por la microglía y astrocitos, principales responsables de la síntesis y liberación de citocinas, como la IL1- β , la cual incrementa durante los primeros 30 min de actividad convulsiva recurrente. La IL1- β , activa la vía de señalización IL-1/TLRs (interleucina 1/ receptores Toll), la cual se ha descrito como responsable de los cambios a corto y largo plazo sobre el umbral convulsivo, principalmente en estructuras mesio-temporales como el hipocampo y la corteza cerebral en el cerebro inmaduro y adulto.

No obstante, en el cerebro inmaduro, se han descrito las alteraciones de la excitabilidad neuronal, generadas por la neuroinflamación, donde se ha observado específicamente el incremento de las proteínas proinflamatorias IL1- β , Cox-2 y TNF- α , las cuales, actúan de forma directa sobre receptores y canales iónicos y de forma indirecta a través de sistemas moduladores de la recaptura glutamato extracelular, por la disminución de los transportadores selectivos a glutamato GLT-1, mediados por los astrocitos, principalmente en CA1 y GD de hipocampo. Así como, por la activación de la iNOS, que a su vez promueve la síntesis de ON, el cual incrementa la liberación de glutamato y de la sustancia P, lo que preserva la activación de citocinas, junto con el incremento de la afinidad de los NMDAr y AMPAr.

Lo anterior descrito, sustenta que la activación de la vía proinflamatoria de IL-1/TLRs incrementa la vulnerabilidad del hipocampo inmaduro a la hiperexcitabilidad neuronal y que dichos cambios dependen de la edad de desarrollo (Cioni y cols., 1998; De Simoni y cols., 2000; Viviani y cols., 2003; Rizzi y cols., 2003; Stellwagen y cols., 2005; Ravizza y cols., 2005; Bessis y cols., 2007; Jarvel y cols., 2008; Yuan-Hao Chen y cols., 2013).

La actividad proconvulsiva de IL1- β a través de los NMDArs, se ha reportado en modelos experimentales en ratas inmaduras, por medio de la administración de un antagonista competitivo selectivo de los NMDArs, que inactiva la actividad IL1- β . Dicho efecto al ser revertido, incrementó la interacción de la IL1- β con los NMDArs a través de la activación de la tirosina cinasa (Src) y la subsecuente fosforilación de la subunidad NR2A/B, lo que resultó en el incremento del Ca^{+2} intracelular (Furukawa y Mattson 1998; Viviani y cols., 2003; Stellwagen y cols., 2005; Di Filippo y cols., 2013).

Adicionalmente, por medio de la técnica Patch clamp en cultivos de neuronas de hipocampo inmaduro, se observó que la administración de TNF- α aumenta el flujo de Ca^{+2} intracelular en un 30% y que el aumento de TNF- α genera un incremento de la expresión de los AMPArs y disminución de los GluR2, por medio de la expresión del TNF-R1 en la superficie membranal neuronal, lo que a su vez, promueve que las neuronas inmaduras sean más permeables a Ca^{+2} . Dicho efecto se ha observado en la corteza cerebral, amígdala y médula espinal (Beattie y cols., 2002; Stellwagen y cols., 2002;2005). De la misma forma, se ha reportado que, la actividad de TNF- α a su vez genera endocitosis de los receptores GABA_A, principalmente en sus subunidades β 2/3, en las neuronas piramidales de CA1 e interneuronas

del GD, lo que favorece la excitación neuronal (Wang y cols., 2000; Balosso y cols., 2005; Stellwagen y cols., 2005; Shimada y cols., 2014).

Por otra parte, la administración i.p. de lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas en ratas de 14 días PN, demostró que, la activación de la inflamación sistémica generada por un patógeno, disminuye el umbral convulsivo y facilita el daño excitotóxico, principalmente en las redes colaterales de Schaffer de las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo, cuya función normal es transferir el estímulo eléctrico de la región CA3 a la región CA1, no obstante, el daño neuronal sobre estas conexiones en el cerebro inmaduro, altera la plasticidad sináptica en el hipocampo, contribuye a la preservación de la hiperexcitabilidad neuronal y participa en la epileptogénesis (Rakhade y cols., 2009; Yuan-Hao Chen y cols., 2013).

Así mismo, el incremento de Cox-2, enzima que cataliza la producción de PGs a partir del ácido araquidónico (AA) incrementa la susceptibilidad convulsiva (Jiang y cols., 2004; Chen y cols., 2004). Adicionalmente, se ha reportado el rápido incremento de la expresión de ARNm de Cox-2 post *Status epilepticus* inducido por AK, mostrando la presencia de neurodegeneración y muerte neuronal en las regiones de CA1 y CA3 del hipocampo inmaduro, a las 12 y 24 h (Rizzi y cols., 2003; Kawaguchi y cols., 2005), lo que sustenta que la respuesta neuroinflamatoria precede al daño neuronal (Rizzi y cols., 2003; Joseph y cols., 2006; Ravizza y cols., 2005) y que a su vez este daño neuronal se asocia al incremento de Cox-2 y a la subsecuente producción de PGs, ROS, activación de mecanismo de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (Gobbo y cols., 2004ab).

De la misma forma, en modelos experimentales de *Status epilepticus* inducido por AK y Litio-pilocarpina (Li-Pilo) en ratas de 12 días PN, se ha reportado el rápido incremento de ROS y de los marcadores mitocondriales de daño oxidativo: Nitrotirosina 3 (3-NT); 4-hydroxynonenal (4-HNE) y proteínas carboniladas, así como la formación de radicales libres 24 h post *Status epilepticus*, siendo responsables de la expresión de neurodegeneración en las regiones de CA1, CA3 y GD de hipocampo, corteza cerebral y tálamo (Patel y Li 2003; Folbergrová y cols., 2010).

La participación de la disfunción mitocondrial sobre el complejo I de la cadena respiratoria (NADH-ubiquinona oxido reductasa) (Cock y cols., 2002; Kudin y cols. 2002), favorece el desarrollo de trastornos neurodegenerativos, como la epilepsia (Shapira y cols., 1990, Tretter y cols., 2004), debido a la excesiva liberación de glutamato, que causa la alteración de mecanismos de recaptura de este neurotransmisor y el incremento de Ca^{2+} intracelular, debido a la saturación de los mecanismos de regulación mediados por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y a las proteínas amortiguadoras de Ca^{2+} (Haglid y cols., 1994). Lo cual genera que, la mitocondria capture el exceso de Ca^{2+} acumulado en la matriz mitocondrial; ello induce la despolarización de la membrana por la inhibición parcial del potencial quimiosmótico y por la acumulación de cargas positivas en la matriz mitocondrial. Esta sobrecarga sostenida, produce una despolarización irreversible por la activación del poro de transición mitocondrial, que constituye una vía por donde el Ca^{2+} retorna al citosol, lo que genera el colapso del potencial quimiosmótico mitocondrial y una reducción de la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP) (Murchison y cols., 2000). La disminución de ATP, a su vez genera disfunción metabólica, producción de ROS, activación de proteasas, fosfolipasas, iNOS, endonucleasas y la inhibición de la síntesis de

proteínas. Además, el ON puede actuar como mensajero retrógrado, potenciando el efecto excitotóxico del glutamato y aumentando su liberación desde las terminales presinápticas (Lorigados y cols., 2013). Así mismo, se ha reportado que la disfunción de complejo I, también puede deberse al incremento de proteínas carboniladas durante la fase subaguda post *Status epilepticus* inducido por Li-Pilo y que esta alteración persiste hasta 5 semanas, periodo en el cual se observa actividad convulsiva espontánea (Folbergrová y cols., 2010).

Los cambios crónicos pueden expresarse en un lapso de tiempo de 2 a 12 semanas en roedores y de meses a años en humanos. Se ha reportado que, durante las dos primeras semanas de vida, el cerebro inmaduro muestra una relativa resistencia al daño excitotóxico, ya que la cantidad de Ca^{+2} que entra a una neurona piramidal está directamente relacionada con la edad de desarrollo postnatal, donde en los tres primeros días de vida, el glutamato incrementa el Ca^{+2} intracelular de forma mínima, en cambio, entre los días 10 al 25 PN, el Ca^{+2} intracelular incrementa notablemente, por la actividad convulsiva recurrente, mostrando muerte neuronal en la región de CA1 del hipocampo, área más vulnerable al daño excitotóxico, debido al incremento de los NMDARs y AMPARs (Kubova y cols., 2001;2011; 2013). A partir de la tercera semana de vida postnatal, se observa mayor muerte neuronal en CA3 y GD (Cavalheiro y cols., 1987; Sankar y cols., 1998; Devin y cols., 2007).

Por lo cual, la hipótesis de la resistencia al daño excitotóxico en la etapa inmadura es poco sustentada, ya que el cerebro inmaduro en respuesta a la pérdida neuronal, promueve la formación de fibras musgosas (*MFS-mossy fiber sprouting*), las cuales a diferencia de lo observado en el cerebro adulto, donde se forman colaterales aberrantes en la capa molecular del GD, en el cerebro inmaduro, se desarrolla un patrón diferente, observando la formación de

fibras musgosas que terminan en la región basal y en el stratum oriens de las dendritas de las neuronas piramidales del CA3, con el incremento de la expresión de la proteína GAP43. La diferencia entre los patrones de daño neuronal del cerebro inmaduro y el cerebro adulto, se debe a la inmadurez de las células granulares del GD, las cuales alcanzan su pico de madurez a partir de la tercera semana de vida postnatal en los roedores (Holmes y cols., 1991ab; Sankar y cols., 2000; 2007ab).

Así mismo, las alteraciones en la neurogénesis observadas posterior al daño por el *Status epilepticus*, facilita la formación de conexiones aberrantes en las neuronas inmaduras, debido al incremento de las proteínas GAP-43 y sinaptoficina, que promueven la formación de redes neuronales aberrantes en la capa molecular del GD y de neuritas en la región supra granular del hipocampo inmaduro, lo que promueve la generación de actividad epileptiforme (Yang y cols., 1998; Haas y cols., 1992; 2001; Parent y col., 2002; Cavazos y cols., 2004; Devin y cols., 2007; Rakhade y cols., 2009).

Por otra parte, se han reportado cambios en estructuras cerebrales como las regiones del tálamo: colículo superior, núcleo subtalámico y núcleo pedunculopontino que a su vez involucran a la sustancia nigra reticulada (SNR), las cuales desempeñan un papel crítico en el control de la propagación de la actividad convulsiva (Druga y cols., 2010). Se ha reportado que el daño excitotóxico generado por el *Status epilepticus*, genera daño severo y muerte neuronal en los núcleos del tálamo y estructuras límbicas a las 12, 24, 48 h y hasta una semana post *Status epilepticus* (Druga y cols., 2010; Kubova y cols., 2001;2011). Se ha reportado que, el daño excitotóxico genera neurodegeneración en los núcleos baso lateral y cortical de la amígdala y en la región de CA1 de hipocampo ventral en ratas de 12 y 14 días PN, en los modelos Li-Pilo

y AK, donde por medio de análisis por resonancia magnética (RM), se observó la reducción del volumen de estas estructuras en la etapa adulta, observando el mismo patrón de daño neuronal en tejido de pacientes con epilepsia de lóbulo temporal (ELT) (Nairismagi y cols., 2006).

De la misma forma, la expresión gliosis en el cerebro inmaduro, es menor en comparación con el cerebro adulto. No obstante, la activación inmediata de la microglía y astrocitos, por los NMDArs, AMPArs y KArs post *Status epilepticus*, se caracteriza por cambios en el citoesqueleto y retracción de las prolongaciones, lo que contribuye con la síntesis y liberación de citocinas y mediadores citotóxicos, que a su vez promueven la muerte neuronal y neurodegeneración (Juha y cols., 2010). De la misma forma, se observa agrupamiento de astrocitos en las regiones del hilus y GD; estas redes alteradas de astrocitos, pueden incrementar la síntesis y liberación de glutamato, debido al aumento energético neuronal, lo que subsecuentemente incrementa el daño neuronal. Los cambios morfológicos en los astrocitos y en la microglía, por la actividad convulsiva recurrente, se han reportado por una mayor expresión de gliosis reactiva, identificada por el incremento de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) post *Status epilepticus*, a partir del día 9 al día 21 PN. Lo cual, sostiene que los cambios estructurales posterior un *Status epilepticus*, son dependientes de la edad de neurodesarrollo (Nairismagi y cols., 2006; Juha y cols., 2010).

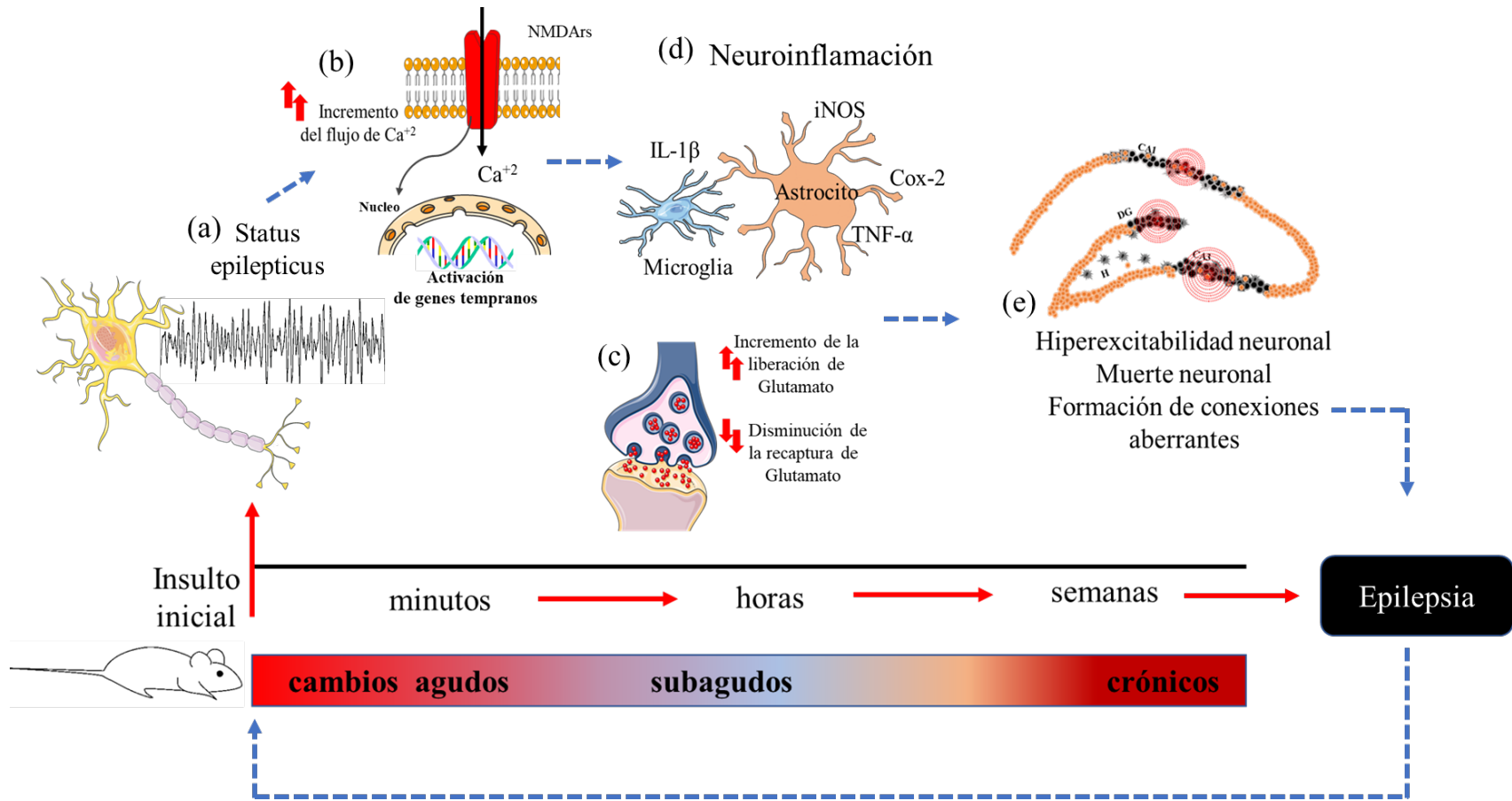


Fig. 2. Epileptogénesis en el cerebro inmaduro. Insulto inicial causado por (a) *Status epilepticus*. Cambios agudos observados de minutos a horas generado por (b) incremento del flujo de Ca^{+2} intracelular, alteraciones de canales iónicos, incremento de afinidad a glutamato por los NMDARs y AMPARs, activación de genes tempranos. Cambios subagudos que involucran (c) activación de microglía y astrocitos que inician la respuesta neuroinflamatoria, mediante la liberación de las citocinas IL1- β , TNF- α y proteínas proinflamatorias iNOS y Cox-2, (d) incremento de la liberación e inhibición de la recaptura de glutamato y fosforilación de los NMDARs, factores que promueven la hiperexcitabilidad neuronal, cambios crónicos, donde se observa (e) hiperexcitabilidad neuronal, muerte neuronal, reorganización de redes neuronales con formación de conexiones aberrantes y formación de fibras musgosas, en hipocampo.

3.2.1.- Vía de señalización proinflamatoria IL-1R/TLRs y su papel en la epileptogénesis.

Lo anteriormente descrito, sustenta la relación recíproca entre el Status epilepticus, el incremento de citocinas proinflamatorias y la muerte neuronal en hipocampo. Sin embargo, existen pocos estudios en el cerebro inmaduro que esclarezcan los mecanismos involucrados en la respuesta neuroinflamatoria. No obstante lo anterior, estudios en modelos experimentales y en tejido de humano, se ha identificado la participación de la vía de señalización proinflamatoria IL-1R/TLRs. La cual se involucra de forma central en el inicio de la respuesta neuroinflamatoria de primer orden (activación de la inmunidad innata), así como en la respuesta del sistema inmune ante un agente patógeno o un daño tisular, en el cerebro inmaduro y adulto (Viviani y cols., 2003; Ravizza y cols., 2005; 2008;2011; Maroso y cols., 2011; Auvin y cols., 2014; Vezzani A. y cols., 2015).

La IL-1 β , es liberada por los astrocitos perivasculares y células endoteliales de la microvasculatura cerebral, lo que, a su vez, contribuye a la ruptura de la BHE, por medio de la activación de la metaloproteasa 9 de la matriz endotelial (MMP9). La MMP9, destruye las uniones estrechas intercelulares que conforman la BHE, lo que facilita la entrada de albumina sérica al parénquima cerebral, esto a su vez activa moléculas señalizadoras de daño como la proteína 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1). La activación de HMGB1, desencadena una respuesta autócrina o parácrina, que genera un rápido incremento de Ca⁺² intracelular por la fosforilación de serinas (Src) de la subunidad NR2B de los NMDArs, lo que promueve la hiperexcitabilidad, daño neuronal y disminución del umbral convulsivo.

La proteína HMGB1, se expresa en los cuerpos neuronales bajo condiciones basales, sin embargo, durante la actividad convulsiva se transloca del núcleo al citoplasma celular y activa a los TLRs, especialmente el TLR4 en neuronas y astrocitos. (Blobe y cols., 2000; Ravizza y cols., 2011; Vezzani y cols., 2011, 2015).

La participación del TLR4 en la actividad convulsiva en ratas inmaduras, fue demostrada en un modelo de crisis convulsivas mediante la inyección sistémica de un LPS, el cual actúa como ligando a TLR4, observando la disminución del umbral convulsivo durante la fase aguda y presencia de actividad epileptiforme en fase crónica (Ravizza y cols., 2005). El efecto proconvulsivante de este LPS fue revertido por medio de la administración de Minociclina, antibiótico que previene la activación de la microglía y liberación de citocinas. De la misma forma, empleando un inhibidor de la caspasa 1 (ICE/Caspasa 1), antagonista de receptor de la interleucina 1 (IL-1ra), se demostró que, la activación de TLR4 puede generar cambios rápidos en la transmisión sináptica y a su vez activar grupos específicos de cinasas, como la cinasa c-Jun-N-terminal (JNK), p38, cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y proteína cinasa C (PKC) (Ravizza y cols., 2006; Auvin y cols., 2007; 2010).

Por otra parte, se ha reportado que HMGB1 puede ser secretada por diferentes células, durante el proceso de necrosis o por un evento estresor. Sin embargo, aún no se conoce completamente bien la participación de HMGB1 en la epileptogénesis (Vezzani y cols., 2019). Al parecer, la localización citoplasmática de HMGB1 permite la metilación, acetilación y fosforilación de diferentes mediadores proinflamatorios celulares, lo que facilita la preservación de la respuesta inflamatoria en el tejido durante la epileptogénesis (Blobe y cols., 2000; Aronica y cols., 2007).

No obstante lo anterior, los efectos inmediatos a la actividad convulsiva aguda mediados por la IL1- β han sido reportados en rebanadas de hipocampo y cultivo de neuronas piramidales de rata. En estos modelos *in vitro*, se observó una disminución de la inhibición sináptica mediada por GABA en la región de CA3 en el hipocampo, incremento de la excitabilidad neuronal mediada por los NMDArs y canales de voltaje a iones Ca^{+2} en CA1, aumento de la permeabilidad al Ca^{+2} por la fosforilación de los canales dependientes de K^{+} y la subsecuente activación de p38 y MAPK (Zhang y cols., 2010). De igual forma, en neuronas piramidales de hipocampo, se ha observado el aumento de la función de los NMDArs por medio de mecanismos no transcripcionales, observando el incremento del flujo de iones Ca^{+2} debido a la activación de Src, que fosforila la subunidad NR2B del NMDArs (Viviani y cols., 2003; Vezzani y cols., 2013).

Por otra parte, se ha reportado que los efectos a largo plazo de la activación de la vía de señalización IL-1R1/TLR permite la perpetuación de la respuesta inflamatoria por la activación de $NF\kappa\text{-}\beta$, que inicia la transcripción de moléculas y proteínas proinflamatorias como Cox-2 y PGs. La expresión de estas moléculas, generan una disminución paulatina del umbral convulsivo, muerte celular y la subsecuente inducción de genes involucrados en los procesos de neurogénesis, reorganización sináptica y plasticidad neuronal (Cacheaux y cols., 2009; Maroso y cols., 2011; Akin y cols., 2011).

Dentro de las proteínas proinflamatorias activadas por la vía IL-R/ $NF\kappa\text{-}\beta$, se encuentra la Cox-2, la cual es un importante mediador de la respuesta inflamatoria. Se ha reportado en modelos experimentales, la participación de Cox-2 en la transmisión sináptica glutamatérgica, ya que Cox-2, se encuentra expresada en niveles basales en los cuerpos neuronales y espinas

dendríticas de neuronas de hipocampo y su actividad es regulada por la actividad sináptica (Kaufmann y cols., 1996; Simmons y cols., 2004). Después de la actividad convulsiva, la vía IL-1R1/TLR4 puede activar a Cox-2 en primera instancia y 1 h después, aumentar su expresión por medio de la activación de los NMDArs. Estos receptores promueven la activación de Cox-2 por medio de la vía de iNOS y la fosforilación de la fosfolipasa A₂, mediante la producción de ácido araquidónico (AA) (Marcheselli y Bazan 1996; Ravizza y cols., 2013; Noe cols., 2013). Se ha reportado que cada molécula de Cox-2 es inactivada después de convertir cerca de 400 moléculas de AA en PGs EP1 y EP2, promoviendo un sistema dinámico en respuesta a los cambios de la actividad neuronal. La actividad de Cox-2 posterior al daño agudo, es regulada por la presencia de NFκ-β. Este factor nuclear inicia la transcripción de los genes que codifican a Cox-2, lo que genera cambios moleculares y celulares que promueven la hiperexcitabilidad neuronal (Riazi y cols 2010; Akin y cols., 2011; Maroso y cols., 2011).

Por otra parte, la movilización de Ca⁺² intracelular activa la producción de PGs que activan los receptores a PGs EP1 y EP2. La activación de EP2, a su vez promueve la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), que daña la BHE y promueve la respuesta inflamatoria (Devinsky y cols., 2013ab). De igual forma, la activación de Cox-2 y la síntesis de PGs promueven la producción de radicales libres, como productos intermediarios, los cuales pueden potenciar el efecto excitatorio del glutamato (Riazi y cols., 2010; Akin y cols., 2011). Las PGs EP2 también puede activarse por la expresión de TNF-α en los astrocitos, lo que a su vez favorece la liberación de glutamato y contribuye a la generación de la actividad epileptiforme (Bezzi y cols., 2001; Fee y cols., 2002; Ding y cols., 2007; Fellin y cols., 2006).

En modelos experimentales, se ha reportado que la inhibición de Cox-2 durante la administración de LPS, disminuye la liberación de glutamato en células granulares de hipocampo, y que la administración exógena de PGE2 puede exacerbarla, lo que sugiere que la hiperexcitabilidad de las células granulares, puede ser mediada por la vía de la PGE2 debido a la expresión de Cox-2. De igual forma, estudios electrofisiológicos en rebanadas de hipocampo de rata, han reportado disminución en la excitabilidad en neuronas piramidales de la región CA1, tras la inhibición selectiva de Cox-2 y la subsecuente disminución de PGE2. Por el contrario, a la aplicación exógena de PGE2, que produce un incremento en la frecuencia de disparo y aumento del potencial de excitación post sináptico, posiblemente derivado de la disminución del flujo de K⁺ en las neuronas piramidales de CA1 (Ravizza y cols., 2006,2011; Akin y cols., 2011, Maroso y cols., 2011).

Cabe resaltar que el daño a la BHE resultante de la activación de la vía IL-1 β /TLR-Cox-2 promueve a su vez la activación del factor de crecimiento transformante beta (TGF)- β , citocina que juega un papel central en la comunicación intercelular, la cual se encuentra involucrada en los procesos de crecimiento celular, embriogénesis, diferenciación celular, morfogénesis y apoptosis (Blobe y cols., 2000). La vía de señalización de TGF- β es mediada por sus receptores TGF- β RI y TGF- β RII. Estos receptores activan un sistema de señalización intracelular por medio de la fosforilación del complejo proteico Smad (por su siglas en inglés, Mothers Against Decantaplegic homolog), que actúan como moduladores de la expresión de genes pertenecientes a múltiples vías de señalización, y en la activación de la vía p38 activada por MAPK (p38 mitogen-activated protein kinases) que participa en los procesos de diferenciación celular, apoptosis y autofagia (Blobe y cols., 2000; Vezzani A. y cols., 2014).

Adicionalmente, la extravasación de albumina sérica genera la sobre regulación de TGF- β , lo que facilita la ruptura de la BHE, permitiendo la unión a su receptor TGF-Br para la activación de la vía de señalización de TGF- β (Cacheaux y cols., 2009; Ivens y cols., 2007). Por otra parte, se ha reportado que el bloqueo de la vía de señalización de TGF- β inhibe la respuesta transcripcional asociada con la activación de la glía, lo que previene la presencia de actividad epileptiforme en etapas posteriores (Vezzani y cols., 2015).

3.3.- Fármacos antiinflamatorios empleados en la clínica y sus efectos en modelos de *Status epilepticus* en ratas inmaduras.

La evidencia clínica y experimental muestra a la neuroinflamación como sustrato común en la etiopatogenia de la epilepsia y se ha establecido que la actividad epiléptica recurrente, preserva la respuesta neuroinflamatoria (Ravizza y cols., 2005; Rizzi y cols., 2003; Vezzani y cols., 2013). Estudios farmacológicos en modelos de *Status epilepticus* y epilepsia incluidos los modelos de epilepsia farmacorresistente en animales adultos, han reportado que el tratamiento con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), antiinflamatorios selectivos de la Cox-2, glucocorticoides como dexametasona y antiepilépticos como el valproato y carbamazepina, reducen la actividad convulsiva espontánea (Jung y cols., 2006; Polascheck y cols., 2010; García-Curran y cols., 2019). De la misma forma, se ha reportado que, los inhibidores selectivos de la Cox-2: el Celecoxib y Rofecoxib disminuyen la muerte neuronal en los subcampos CA1 y CA3 del hipocampo, posterior al *Status epilepticus* inducido por AK y Li-Pilo, estableciendo la existencia de un efecto neuroprotector que, sin embargo, no llega a ser antiepileptogénico, debido a que no protegen las estructuras adyacentes al hipocampo como

amígdala, el tálamo y la corteza piriforme, que participan en la propagación de la actividad convulsiva (Kuntz y cols., 2001; Kawaguchi y cols., 2005; Holtman y cols., 2009).

Adicionalmente, se ha investigado el uso de inhibidores selectivos de la Cox-2 como: Celecoxib, Rofecoxib, Nimesulida y no selectivos como la Aspirina y el Naproxeno (AINEs), como potenciales anticonvulsivos en modelos de crisis convulsivas generalizadas inducidas por pentilinetetrazol (PTZ) en ratones. Mostrando que la administración oral de dichos fármacos 45 min después de la administración de PTZ, incrementa las latencias de la actividad convulsiva tónico clónica y reduce el tiempo de recuperación post crisis (Dhir y cols., 2006; Rojas y cols., 2018). Sin embargo, la administración de Nimesulida y Celecoxib (Clbx) en ratas adultas 1 h antes de la administración de AK, mostró un aumento la severidad de las crisis convulsivas y mayor mortalidad (Kunz y Oliw, 2001a; Gobbo y O'Mara, 2004), así mismo, se ha reportado que la administración crónica de Clbx incrementa la severidad convulsiva inducida por AK (Toscano y cols., 2008). Lo que sustenta, que el Clbx, no tiene efectos anticonvulsivos convulsivos y que únicamente ejerce efectos neuroprotectores al ser administrado posterior a un *Status epilepticus* (Gobbo y O'Mara, 2004). Adicionalmente, se ha reportado que la administración de 20 mg/kg de Celecoxib 30 min después de la administración de AK en ratas Sprague Dawley de 10 PN de edad, disminuyó las latencias de inicio y mortalidad en un 70%, en un modelo de *Status epilepticus* recurrente (Morales-Sosa y cols., 2018).

3.3.1.- Efectos secundarios de los antiinflamatorios no esteroideos y antiinflamatorios selectivos de Cox-2.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), son un grupo de fármacos antiinflamatorios, inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa (Cox)-1 y Cox-2, y por lo tanto de la síntesis de tromboxanos y PGs, sin embargo, al inhibir simultáneamente a la Cox-1 y Cox-2, tienen la capacidad de causar hemorragias en el tracto digestivo y formar úlceras gastroduodenales. Por otra parte, los inhibidores selectivos de la Cox-2, inhiben la síntesis de prostaciclina sin tener efecto sobre la acción de la Cox-1, la cual se encuentra en el tracto gastrointestinal, riñones y plaquetas. Ambas enzimas Cox-1 y Cox-2, poseen características y funciones diferentes, por ello al ser bloqueadas de forma simultánea, produce efectos secundarios gastrointestinales, renales y plaquetarios (Silverstein y cols., 2000; Katzung y cols., 2007; Bhala y cols., 2013).

El AINE prototipo es la aspirina y los derivados del ácido propanóico como el ibuprofeno y naproxeno; derivados del ácido acético como la indometacina y ácidos enólicos como la piroxicam, los cuales inhiben el AA sobre el sitio activo de la ciclooxigenasa. Sin embargo, su uso crónico genera irritación de la mucosa gástrica, como efecto adverso más común y son causa de úlcera péptica, también pueden producir hemorragias del tracto digestivo, vértigo, cefaleas, fatiga, sueño, y en ocasiones reacciones alérgicas de consideración (Antman y cols., 2007; Bhala y cols., 2013).

El uso a largo plazo de Ibuprofeno y fármacos derivados del ácido propiónico como el Piroxicam, Diclofenaco y Benzamina, puede causar alteraciones cognitivas, irritabilidad y

pérdida de memoria, así como fotosensibilidad asociada a una inflamación paradójica en presencia de luz solar, además de falla hepática, renal y alteraciones pulmonares como edema laríngeo, asma bronquial y tromboembolismos. Por lo cual, están contraindicados su uso durante la infancia y el embarazo, ya que puede producir malformaciones durante la etapa fetal (Antman y cols., 2007; Katzung y cols., 2007; Bhala y cols., 2013).

De la misma forma, se ha reportado que los Coxib, aumentan en un 37 % el riesgo de sufrir obstrucción vascular que genera infartos al miocardio o debilidad del endotelio vascular que puede generar un evento cerebrovascular (EVC), formación o perforación de úlceras gastrointestinales y hemorragias gastrointestinales. Por otra parte, el componente sulfonamida del Clbx, puede causar alergias en pacientes sensibles a dicho compuesto, causa por la cual, algunos Coxib, han sido retirados del mercado y su uso está altamente contraindicado en pacientes pediátricos (Silverstein y cols., 2000; Katzung y cols., 2007).

3.4.- *Magnolia officinalis*.

La *Magnolia*, planta endémica de América y Asia, de uso importante en la medicina tradicional China y japonesa es conocido como *Houpu* o extracto de *Magnolia*, a la cual se le atribuyen efectos ansiolíticos, antioxidantes y antiinflamatorios. De la familia de la *Magnolia* se desprenden las especies *officinalis*, *grandiflora*, *albata* y *obovata*, de las cuales se han identificado cerca de 225 componentes diferentes, como alcaloides, cumarinas, flavonoides, lignanos, neolignanos fenilpropanoides y terpenoides (Tachikawa y cols., 2000), destacando concentraciones elevadas de dos fenilpropanoides, componentes poli-fenólicos: honokiol (3',5-

di-2-propenil-1,1'-bifenil-2,4'-diol) y magnolol (5,5'-di-2-propenil-2,2'-dihidroxibifenil) ambos con una estructura homologa, que les confiere efectos similares sobre el SNC (Lee y cols., 2009). Se ha reportado que la especie *Magnolia officinalis* (MO) posee mayor cantidad de honokiol y magnolol 1.25 y 1.8% respectivamente, siendo mayor mente empleada para la síntesis de estos compuestos, empleados actualmente en forma de suplementos alimenticios y a nivel experimental como antiinflamatorio, analgésico y como potencial alternativo de tratamiento para enfermedades neurodegenerativas (Lee y cols., 2011).

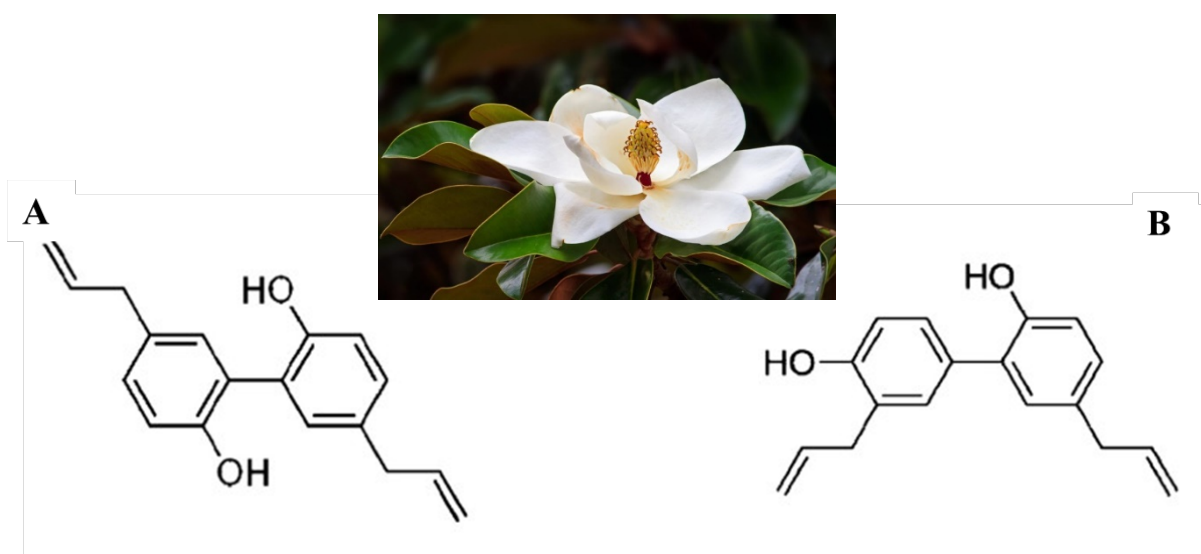


Fig. 3.- Flor de la *Magnolia officinalis*. A) Magnolol 5,5'-di-2-propenil-2,2'-dihidroxibifenil, fórmula molecular: $C_{18}H_{18}O_2$, peso molecular: 226.334, solubilidad: Lipofílica, Receptor: GABAA, NFk- β , NMDA. B) Honokiol 3',5-di-(2-propenil)-1,1'-bifenil-2,4'-diol, fórmula molecular: $C_{18}H_{18}O_2$, peso molecular: 226.334, solubilidad: Lipofílica. Receptor: GABAA, NFk- β , NMDA.

3.4.1.- Efecto antiinflamatorio de la *Magnolia officinalis*.

El estudio de las propiedades terapéuticas de la MO en la medicina occidental, se ha dirigido a los efectos antiinflamatorios y neuroprotectores atribuidos a los principios activos honokiol y magnolol, los cuales poseen un amplio espectro de efectos. Se ha reportado que el efecto antiinflamatorio de dichos compuestos se asocia a la disminución de ON y a la expresión de iNOS, TNF- α , Cox-2, IL1- β , la producción de PGs, tromboxanos y leucotrienos por medio de la inhibición de la activación de la vía de MAPK, AP-1 y NF κ - β (Munroe y cols., 2007; Kuo y cols., 2010; Murakami y cols. 2012; Zhang y cols., 2013).

Adicionalmente, en modelos de isquemia por oclusión de la arteria cerebral media en ratones, se ha reportado la capacidad antioxidante del honokiol al preservar el potencial de membrana mitocondrial y la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa por la disminución de ROS y preservación de la función enzimática mitocondrial, que facilita la preservación neuronal y reduce el área de penumbra (Liou y cols., 2003; Chen y cols., 2007).

Por otra parte, el honokiol disminuye la intolerancia a la glucosa post-isquémica, a través de la activación de componentes de la vía de señalización de receptores a insulina y adiponectina (PEPCK y AMPK, respectivamente) lo que sugiere la capacidad del honokiol de modular el metabolismo de la glucosa como posible mecanismo neuroprotector sobre el daño excitotóxico (Harada y cols., 2012). Adicionalmente, el magnolol y honokiol inhiben la infiltración de neutrófilos post daño isquémico, por medio de la inhibición de la proteína de densidad post sináptica (PSD95) y la expresión del óxido nítrico sintetasa neural (nNOS)

dependiente de Ca^{+2} , (PSD95-nNOS) que se acoplan a los NMDArs y aumentan el flujo de Ca^{+2} intracelular (Wang y cols., 2011; Hu y cols., 2013).

Adicionalmente, en modelos de toxicidad por beta-amiloide ($\text{A}\beta$) en ratones, se ha reportado que el honokiol inhibe la actividad de la Caspasa-3 y disminuye la producción de ROS (Lee y cols., 2010). Así mismo en modelos de inflamación por LPS, se ha observado que el honokiol y magnolol disminuyen la expresión de $\text{TNF-}\alpha$ y ROS (Chao y cols., 1995; Lee y cols. 2010). Adicionalmente en modelos de analgesia se encontró que el honokiol bloquea la respuesta al dolor mediante la inhibición de los NMDArs, sustancia P y PGs EP2 (Lin y cols., 2009).

3.4.2.- Efectos depresor, analgésico y anticonvulsivo de la *Magnolia officinalis*.

En 1980 se reportó por primera vez los efectos depresores a dosis altas de honokiol y magnolol sobre el SNC (Watanabe y cols., 1980), así como efectos ansiolíticos a dosis bajas (Kuribara y cols., 1999). Por lo cual, debido a su posible potencial terapéutico sobre trastornos neurodegenerativos, se evaluó el efecto del honokiol y el magnolol en modelos *in vitro* en cultivos de células granulares de hipocampo de rata, donde se observó la capacidad del honokiol de inhibir la despolarización repetida de la neurona por medio del bloqueo de glutamato sobre los NMDRs y el incremento de K^{+} intracelular (Lin y cols., 2005; 2006; 2009). Posteriormente, se evaluó la administración i.p. de magnolol y honokiol (1 y 5 mg/kg respectivamente) sobre la administración i.v. de NMDA (10 mg/ml) observando un aumento en las latencias de la actividad convulsiva (Lin y cols., 2005).

De manera similar, en modelos in vivo en ratones y ratas, se ha reportado que los efectos sedantes y ansiolíticos del honokiol y magnolol, están dados a través de un mecanismo de acción similar al de las benzodiazepinas, debido a que interaccionan con los receptores GABA_A en su subunidad alfa (α 1-6). Se ha reportado, que la administración única vía oral de honokiol aumenta la actividad exploratoria y disminuye el comportamiento ansioso en ratas adultas y que la administración repetida de dosis bajas (0.2 mg/kg honokiol) tiene mayor efecto ansiolítico con menores efectos secundarios cognitivos y motores, en comparación con el Diazepam. Dicho efecto fue corroborado al administrar flumazenil y bicuculina vía subcutánea, antagonistas del receptor GABA_A (Kuribara y cols., 1999; Ai y cols., 2001). Ambos compuestos incrementaron la neurotransmisión GABAérgica en hipocampo a nivel del GD y mostraron mayor eficacia sobre los receptores GABA_A que contienen la subunidad delta (δ) (Alexeev y cols., 2012; Fuchs y cols., 2014).

Adicionalmente, se infiere que el efecto del honokiol y del magnolol sobre la transmisión GABAérgica se relaciona con el incremento en la síntesis de la enzima GAD65 y no directamente con la actividad de los receptores GABA_A, lo que sugiere que su uso a largo plazo, no causa desensibilización de los receptores a GABA_A (Ku y cols., 2011). En un modelo de crisis convulsivas inducidas por PTZ en ratones, se observó que la administración, del extracto etanólico de MO incrementó las latencias de la actividad convulsiva, reportando efectos anticonvulsivos similares al Diazepam (Chen y cols., 2011). Por otra parte, la administración oral de 300 mg/kg de MO y *Magnolia de Albata* aumentaron el efecto sedante del fenobarbital (Martínez y cols., 2006). Se ha reportado que, la sinergia de ambos compuestos honokiol y magnolol muestran mayor efecto anticonvulsivo (Qiang y cols., 2009).

3.4.3.- Farmacocinética del honokiol y magnolol principales activos de la *Magnolia officinalis*.

Investigaciones recientes sobre la actividad del magnolol en ratas Sprague Dawley tratadas con 2.5 mg/kg y 10 mg/kg i.v. de magnolol, reportaron una vida media en plasma de 54.1 ± 5.14 y 49.58 ± 6.81 min respectivamente. De la misma forma fue evaluada la vida media del honokiol en ratas Sprague Dawley, tratadas con 5 mg/kg y 10 mg/kg i.v., reportando una vida media de 49.22 ± 6.68 y 56.2 ± 7.73 min, lo que sugiere actividad similar e independiente en ambos componentes (Tsai y cols., 1996; Sarrica y cols., 2018).

Por otra parte, estudios relacionados también en ratas Sprague Dawley, pero tratadas con 50 mg/kg de magnolol, han reportado que este es metabolizado a isomagnolol hidrogenado y en hidroxil derivados glucurónicos y sulfatos, lo que sugiere la participación de enzimas hepáticas y bacterias intestinales involucradas en el proceso de eliminación de dicho componente por excreción biliar, heces y orina, lo cual ha sido corroborado por cromatografía líquida de alta resolución más espectrofotometría de masas (HPLC/MS) a las 12 y 24 h, después de la administración v.o. e i.p. en cada caso, observando bioactividad en sangre a los 15min y a las 8 h posterior a la administración de magnolol, lo que sugiere la circulación enteropática del magnolol y sus metabolitos (Li y cols., 2007; Lin y cols., 2011).

Por otra parte, el análisis por medio de perfusión aislada de hígado de ratas Wistar a las cuales se les administraron 10 μ M de honokiol durante 90 min vía perfusión, muestra la biotransformación hepática y disposición del honokiol y sus metabolitos, donde fue extraído casi el 99% del honokiol administrado, obteniendo concentraciones estables de honokiol a los 30 min después del inicio de la infusión, donde solo el 0.03% de la dosis administrada se

encontró en bilis y el 0.66% en el efluente perfundido. El 80% de la dosis de honokiol administrada fue concentrada en el hígado, donde el análisis de la bilis y del flujo perfundido por medio de HPLC/MS, reportaron la formación de dos metabolitos llamados glucurónidos y sulfato-monohidroxy-honokiol (M1) y (M2) respectivamente. Dichos resultados sugieren que el honokiol al igual que el magnolol son extensamente metabolizado por el hígado y excretados por la bilis y las heces (Li y cols., 2007).

Adicionalmente se evaluó la biodisponibilidad de honokiol y el magnolol al administrarlos v.o. a dosis de 20 y 50 mg/kg, lo cual alcanzó una concentración 1 h post administración ($0.16 \pm 0.023 \mu\text{gr}$), la cual permaneció constante a las 6 h, observando una disminución lineal a las 16 h, post administración (Hattori y cols., 1986). Sin embargo, no existen aún estudios farmacocinéticos de honokiol o magnolol en humanos, únicamente en roedores adultos (Li y cols., 2007). Por otra parte, se ha identificado metabolitos hidroxilados del honokiol conjugados con ácido glucurónico y sulfúrico y monoglucurónido de honokiol en hígados de rata aislados perfundidos con 10 mM de honokiol. Lo anterior ha permitido establecer que la glucuronidación y la sulfatación fueron los principales procesos involucrados en las vías metabólicas del hígado del fenilpropanoide, estableciendo en primera instancia a la oxidación como la principal vía metabólica y de manera secundaria a la glucuronidación, la sulfatación, la acetilación y la conjugación de aminoácidos como la principal vía metabólica (Liu y cols., 2007; Liu y cols., 2013).

3.4.4.-Mutagenocidad y genotoxicidad del honokiol y magnolol componentes de la *Magnolia officinalis*.

La mutagenicidad de la MO, fue evaluada en cepas de *Salmonella typhymurium* y en cepas de *Escherichia coli*, donde un 95% de magnolol y 1.5% de honokiol, no incrementan el número medio de revertientes por placa en *Salmonella typhymurium* y *Escherichia coli*, concluyendo que no es mutagénica bajo condiciones experimentales (Li y cols., 2007; Zhang y cols., 2008). Del mismo modo, se evaluó la genotoxicidad de la MO compuesto por un 94% de magnolol y 1.5% de honokiol en dos ensayos in vitro de aberración cromosomal en células de ovarios de hámsters chinos y en células de pulmón. Adicionalmente la misma prueba fue desarrollada en ratones albinos suizos, hembras y machos, de 7 a 9 semanas de edad. La administración oral de honokiol y magnolol a razón de 625 mg/kg y hasta 2.500 mg/kg; tanto honokiol como magnolol no afectaron la proporción de eritrocitos inmaduros ni el número de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos, además de no incrementar de forma significativa la proporción de eritrocitos en ninguno de los grupos tratados (Nachtergaele y cols., 2015).

Estudios en ratones, a los cuales se les administro extracto de corteza de MO a razón de 50 g/kg y 8.5 g/kg i.p., mostraron actividad toxica mínima. Por otra parte, estudios de toxicidad subaguda, realizados con la administración de 5 a 10 g/kg del extracto de MO por 14 días, reportaron una disminución de los niveles de alanina aminotransferasa y creatinina, así como un incremento en los niveles de BUM en ratas macho, aunque no se observaron diferencias en ninguno de los otros parámetros (Cheng y cols., 2003; Liu y cols., 2007). Adicionalmente, se ha reportado en ratas de 6 a 7 semanas de edad, con un peso de 100 a 120 g, las cuales se les administró MO a una concentración de 90% magnolol y 1.5% de honokiol v.o., en dosis que

iban de 60 mg/kg hasta 480 mg/kg durante 21 días y en dosis de 60 mg/kg hasta 240 mg/kg por 90 días, no se presentan efectos tóxicos, observando preservación de la función renal sin restos microscópicos o macroscópicos hematológicos en orina. Tampoco se reportan fallecimientos en los sujetos de los grupos de estudio ni diferencias significativas entre los pesos de los órganos, reportando un índice NOAEL > 240 mg/kg/día (Cheng y cols., 2003; Liu y cols., 2007).

3.5.- Modelo de *Status epilepticus* inducido por ácido kaínico en ratas inmaduras.

El uso de modelos experimentales de *Status epilepticus* en ratas inmaduras y prepuberales, son una herramienta importante para el estudio de los mecanismos implicados en la epileptogénesis y en la epilepsia desarrollada en etapas posteriores o adultas (Holmes y cols., 1991ab; Stafstrom y cols., 2002; 2015). Para el desarrollo de este tipo de modelos, se han empleado fármacos que generan daño en estructuras como el hipocampo, amígdala y corteza, estructuras involucradas en la ELT en humanos, la cual, en la mayoría de los casos, posee una etiología de inicio temprano; además de que la ELT, comprende cerca del 60% de los casos de epilepsia a nivel mundial (Löscher y cols., 2010; Kubova y cols., 2012).

El ácido kaínico (AK), genera actividad excitatoria en neuronas del SNC de vertebrados, por lo que ha sido empleado como quimioconvulsivante en modelos experimentales de *Status epilepticus* en la etapa inmadura y adulta (Ben-Ari y cols., 1985; Sperk y cols., 1994; Sarkisian y cols., 1997; Ben-Ari y Cossart 2000). El AK es una sustancia con estructura análoga al ácido glutámico, que actúa como agonista de los AMPARs y Kars, cuya densidad es mayor en el hipocampo inmaduro, especialmente en la región de CA1, también en

la amígdala, corteza peririnal y la corteza entorrinal (Nadler y cols., 1979; Sperk y cols., 1994). La actividad excitotóxica del AK es dependiente de la dosis, produce daño en el soma neuronal y dendritas de las neuronas piramidales del hipocampo, así como muerte neuronal en los subcampos de CA1, CA3 y GD de hipocampo, dichas alteraciones son responsables de la disminución del umbral convulsivo y de la despolarización repetida (Nadler y cols., 1979, Lothman y cols., 1991; Rubio y cols., 2010; Auvin y cols., 2014).

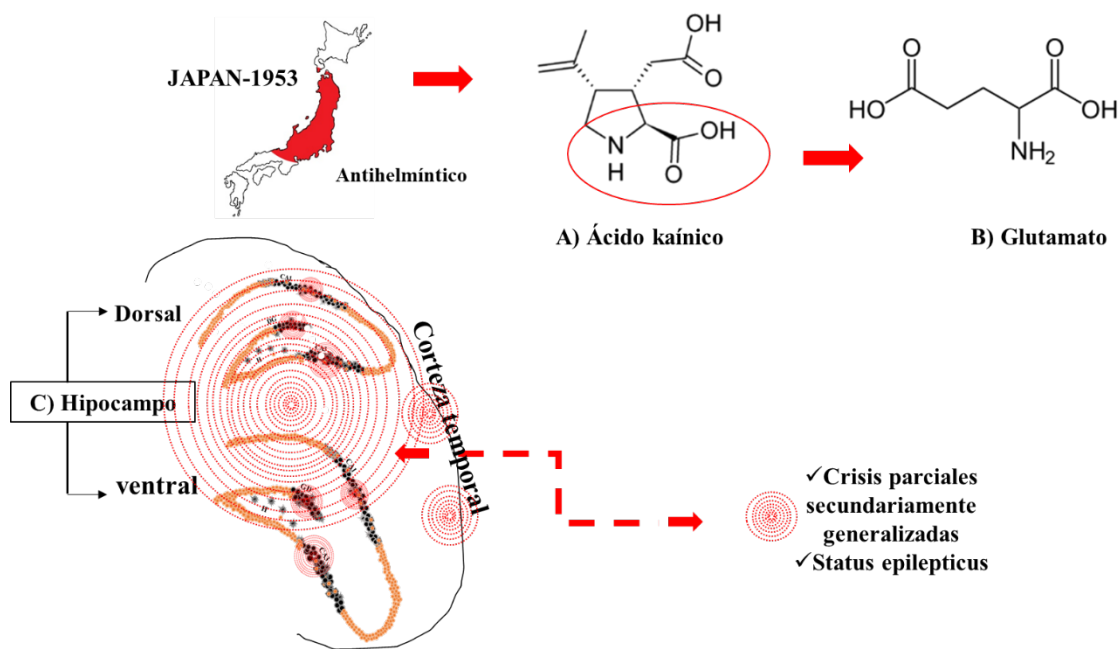


Fig. 4. Ácido kaínico. A) Estructura molecular del ácido kaínico (AK). B) Estructura molecular del glutamato. C) Generación de actividad convulsiva en las estructuras del hipocampo y propagación a la corteza temporal, que causan crisis parciales complejas secundariamente generalizadas y *Status epilepticus*.

El AK reproduce en ratas el mismo patrón de daño en hipocampo, amígdala, tálamo y corteza cerebral observado en tejido resecado de pacientes con ELT (Ben-Ari y cols. 1985; Engel J Jr y cols., 2001), por lo anterior, el AK se emplea como quimioconvulsivante en modelos de epileptogénesis en la etapa inmadura y adulta (Cavalheiro y cols., 1982, Stafstrom

y cols., 2002), siendo capaz de reproducir crisis parciales complejas secundariamente generalizadas de tipo del lóbulo temporal, generando daño en el hipocampo ventral, el cual se establece como la principal estructura epileptogénica, con mayor susceptibilidad durante las dos primeras semanas de vida (Cavalheiro y cols., 1982; dos Santos y cols., 2000ab). Se ha reportado que, el Status epilepticus recurrente inducido por AK en ratas de dos semanas de edad postnatal, permite la generación de cambios histopatológicos, moleculares y conductuales, similares a los observados en los modelos en ratas adultas y que el uso de administraciones consecutivas de AK generan a largo plazo aumento de la susceptibilidad convulsiva (Sarkisian y cols., 1997; Haas y cols., 2001).

La expresión motora de las crisis convulsivas de tipo parcial complejo inducidas por AK en ratas, se caracteriza de forma general por hipoactividad presente a los pocos minutos posterior a la administración de AK, seguida de actividad motora compleja, en la cual el registro por electroencefalograma (EEG), se identifica actividad de alta frecuencia en hipocampo y corteza temporal (Cavalheiro y cols., 1982, Stafstrom y cols., 1993; Wasterlain y cols., 2002; Zayachkivsky y cols., 2012).

3.5.1. Descripción de la conducta motora del *Status epilepticus* inducido por ácido kaínico en ratas inmaduras.

Ben Ari (1981), establecieron que la evolución de la conducta motora inducida por la actividad convulsiva subsecuente a la administración del AK en ratas de la cepa Sprague Dawley y Wistar de 2 semanas de vida PN, es específica de la edad. La administración sistémica por vía intraperitoneal de AK produce hipoactividad por un tiempo promedio de 10 a 20 min, seguido de movimientos de rascado continuo descritos como movimientos consistentes, repetitivos de alta frecuencia de flexión y extensión de las extremidades posteriores dirigidas a la región de la nuca, que ocurren de forma brusca y cuya duración es en promedio de 2 a 5 seg, involucrando cualquiera de las dos extremidades posteriores de forma independiente, acompañados de movimientos espasmódicos de tronco, mioclonías de cabeza, masticaciones, bostezos y pérdida de la postura (Albala y cols., 1984; Cherubini y cols., 1983; Okada y cols., 1984; Tremblay y cols., 1984); estableciendo esta característica conductual como la primera evidencia de actividad convulsiva, asociada a descargas electroencefalográficas que persisten muchas horas más posterior a la administración de AK (Fig. 5) (Dzhala y cols., 2005; Raol y cols., 2009; Moreira y cols., 2011; Zayachkivsky y cols., 2012).

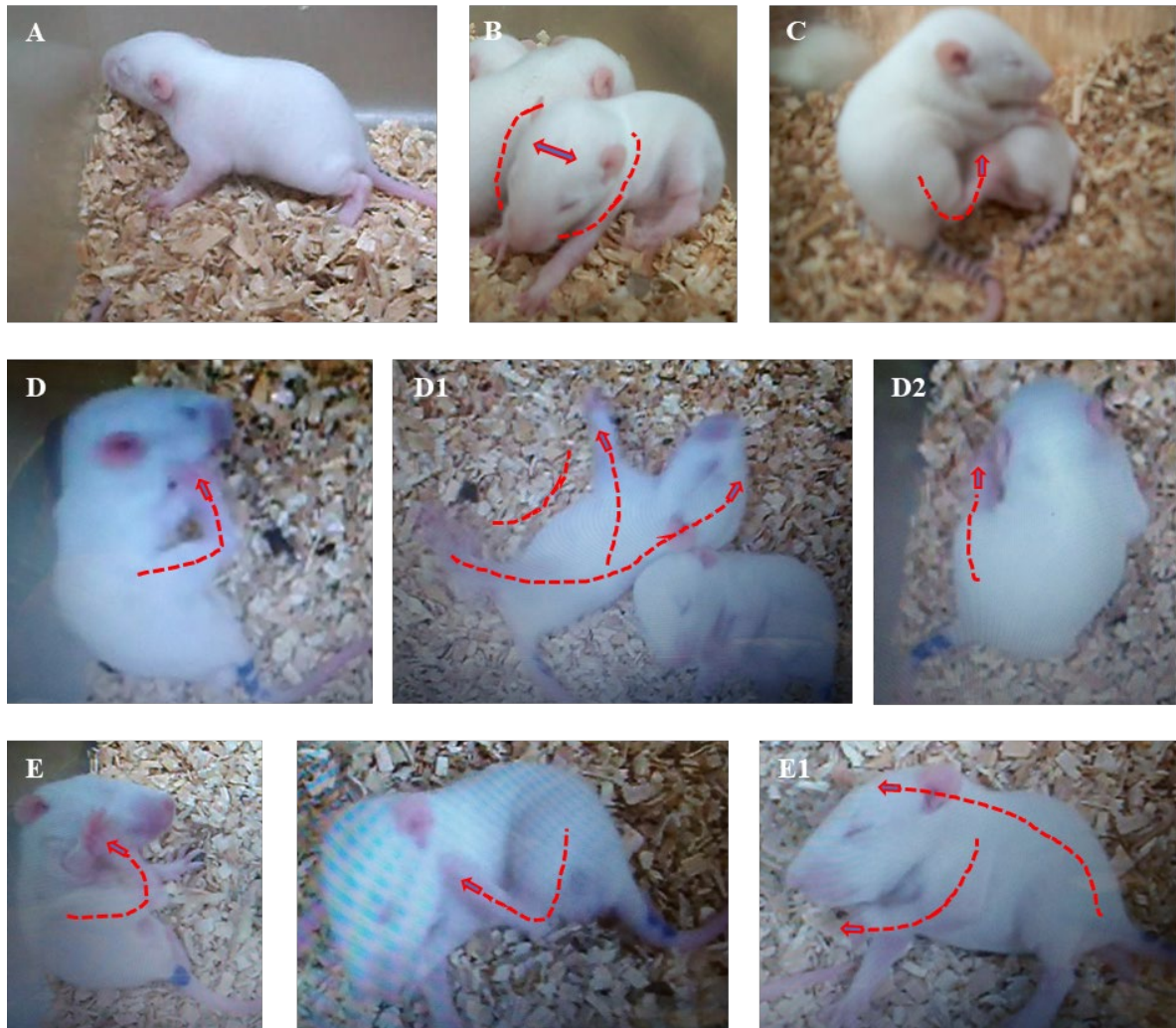


Fig. 5. Imágenes de ratas de 10 días postnatales (PN) tratadas con ácido kaínico (AK) que muestran la evolución de la conducta motora posterior a la administración i.p. de AK: A) No responde a estímulos. B) Movimientos espasmódicos, sacudidas y estiramientos de cadera y cola. C) Movimiento de rascado unilateral con extremidad inferior y posición sobre su costado. D) Movimiento de rascado bilateral con extremidades inferiores que involucra: D1) Pérdida de la postura con recuperación de la misma y D2) Movimiento de rascado bilateral; E) Mioclonías de las cuatro extremidades. E1) Pérdida de la postura sin recuperación de la misma. *Status epilepticus*: estado continuo e irreversible de crisis convulsivas cuya duración es mayor a los 30 min o crisis convulsivas discontinuas cuya duración sea mayor a los 30 min, sin regreso a la función normal entre crisis (Sarkisian y cols., 1997; Lowenstein y cols. 1999; Zayachkivsky y cols., 2011).

4.- JUSTIFICACIÓN.

Durante los períodos críticos del neurodesarrollo, las condiciones del cerebro inmaduro son dirigidas a promover procesos de plasticidad y sinaptogénesis; así como la organización de redes neuronales esenciales para funciones específicas en la etapa adulta (Plotkin y cols., 1997; Ben Ari, 2002; Sayin y cols., 2015). Sin embargo, el cerebro inmaduro, es altamente susceptible al daño por hipertermia, hipoxia y trauma cráneo encefálico, debido a que pueden desencadenar una respuesta neuroinflamatoria. Estos eventos pueden generar alteraciones de la excitabilidad neuronal, que promueven el desarrollo de actividad convulsiva recurrente y el establecimiento un *Status epilepticus* (Dube y cols., 2005; Sankar y cols., 2007; Ravizza y cols., 2006; Ravizza y cols., 2008; Suchomelova y cols., 2015).

La evidencia clínica y experimental establecen un estrecho vínculo entre la etiopatogénesis de la epilepsia y la respuesta neuroinflamatoria, así como entre la activación de la vía de la IL1- β y la expresión de las proteínas Cox-2, iNOS, NF κ - β y TNF- α ; las cuales se han identificado como promotoras del proceso de epileptogénesis (Vezzani y cols., 2008;2013; Ravizza y cols., 2005; 2006; 2008; Suchomelova y cols., 2015; Dichter y cols., 2009). De tal forma que, se ha reportado como el uso de tratamientos antiinflamatorios e inmunosupresores, reducen el daño neuronal producido por la actividad convulsiva. Aunque estos, no ejercen efectos antiepileptogénicos y se ha demostrado que su uso en etapas tempranas del neurodesarrollo produce diversos efectos secundarios (Polascheck y cols., 2010; Löscher y cols., 2010).

Lo anterior, ha colocado a las plantas medicinales de uso tradicional, incluyendo a la MO como una alternativa de tratamiento, cuya utilidad terapéutica se atribuye a sus principios

activos honokiol y magnolol. Estos compuestos han sido probados en modelos experimentales, destacando su uso en modelos *in vitro* de excitotoxicidad neuronal e *in vivo* de isquemia cerebral en ratas, donde se ha reportado como modulador de la respuesta inflamatoria sobre la producción de ON e iNOS y de proteínas proinflamatorias como Cox-2, IL1- β , TNF- α y NF κ - β , (Son y cols., 2000; Matsuda y cols., 2009; Zhang y cols., 2013).

Por lo tanto, debido a las serias implicaciones de la neuroinflamación y al uso contraindicado de AINEs e inhibidores selectivos de Cox-2 durante el neurodesarrollo, fue de nuestro interés evaluar el efecto de la MO sobre la neuroinflamación, el daño neuronal, la hiperexcitabilidad neuronal y el proceso de epileptogénesis en el cerebro inmaduro.

5.- HIPÓTESIS.

“La *Magnolia officinalis* reducirá la neuroinflamación producida por el Status epilepticus recurrente inducido con ácido kaínico en ratas inmaduras, así como el subsecuente daño neuronal, la hiperexcitabilidad neuronal y la epileptogénesis”.

6.- OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto de la *Magnolia officinalis* sobre la neuroinflamación, el daño neuronal, la hiperexcitabilidad cerebral, y el proceso de epileptogénesis en ratas inmaduras sometidas a *Status epilepticus* recurrente inducido con ácido kaínico.

6.1.- OBJETIVOS PARTICULARES.

1.- Evaluar el efecto antiinflamatorio de la *Magnolia officinalis* post modelo de *Status epilepticus* recurrente inducido por AK, en ratas macho de la cepa Sprague Dawley al día 14 PN.

1.1.- Cuantificar la expresión de las proteínas pro inflamatorias, IL1- β , Cox-2, iNOS, NF κ - β y TNF- α , por medio de la técnica Western blot, en hipocampo, posterior al modelo de Status epilepticus recurrente, en el hipocampo, a las 6 h y 24 h post tratamiento con y sin *Magnolia officinalis*.

2.- Evaluar el efecto neuroprotector de la *Magnolia officinalis* en el hipocampo al día 30 PN (16 días post modelo de Status epilepticus recurrente).

2.1.- Cuantificar el número de neuronas preservadas en las regiones de CA1, CA3, GD e hilus de el hipocampo dorsal y ventral, por medio de la técnica de inmunohistoquímica por marcaje con Neun-N, en los grupos con y sin tratamiento subcrónico con *Magnolia officinalis*.

2.2.- Cuantificar el número de células gliales en las regiones de CA1, CA3, GD e hilus de hipocampo dorsal y ventral, por medio de la técnica de inmunohistoquímica por marcaje con GFAP, en los grupos con y sin tratamiento subcrónico con *Magnolia officinalis*.

3.- Evaluar el efecto neuroprotector de la *Magnolia officinalis* sobre la susceptibilidad convulsiva al día 90 PN (76 días post modelo de Status epilepticus recurrente).

3.1-Evaluar la hiperexcitabilidad neuronal por medio de la determinación del umbral post descarga (UPD) en hipocampo ventral día 90 PN, en los grupos con y sin tratamiento subcrónico con *Magnolia officinalis*.

3.2.-Evaluar la actividad epileptiforme por medio de EEG en el hipocampo ventral al día 90 PN, en los grupos con y sin tratamiento subcrónico con *Magnolia officinalis*.

4.- Evaluar el efecto neuroprotector de la *Magnolia officinalis* al día 90 PN (76 días post modelo de Status epilepticus recurrente inducido por AK) en el hipocampo.

4.1.- Cuantificar el número de neuronas preservadas en las regiones de CA1, CA3, GD e hilus de hipocampo dorsal y ventral, empleando la técnica de inmunohistoquímica por marcaje con Neun N, en los grupos con y sin tratamiento subcrónico con *Magnolia officinalis*.

4.2 Evaluar cualitativamente la presencia de gliosis las regiones de CA1, CA3, GD e hilus de hipocampo dorsal y ventral, empleando la técnica de inmunohistoquímica por marcaje con GFAP, en los grupos con y sin tratamiento subcrónico con *Magnolia officinalis*.

7.- METODOLOGÍA.

7.1.- Diseño experimental.

7.1.1.-Tipo de estudio:

- Comparativo, experimental, prospectivo y longitudinal.

7.1.2.- Universo de estudio:

- Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley.

7.1.3.- Criterios de inclusión:

- Ratas machos, sanas, de la cepa Sprague Dawley, de 10 días de edad, con un peso de 20 a 25g al inicio del experimento.

7.1.4.- Criterios de exclusión:

- Ratas enfermas, que no cumplan con el peso requerido al inicio del experimento o mueran antes de cumplir con la edad requerida al término del mismo.

7.1.5.- Variables independientes:

- Ácido kaínico (AK).
- Solución salina.
- Celecoxib.
- *Magnolia officinalis* (MO).
- Diazepam.

7.1.6.- Variables dependientes:

- *Status epilepticus*.
- Expresión de las proteínas IL1- β , Cox-2, iNOS, NF κ - β y TNF- α en el hipocampo.
- Número neuronas preservadas en hipocampo.
- Gliosis reactiva en el hipocampo.

7.2.- Animales de experimentación.

Inicialmente, se seleccionaron ratas hembras, adultas, empleadas para obtener las crías requeridas en el estudio, las cuales fueron habituadas al manejo del investigador antes y durante la gestación, para minimizar los efectos negativos del estrés materno provocado por el manejo y separación de las crías durante el periodo de lactancia. Las ratas se mantuvieron alojadas en cajas individuales, a temperatura regulada de $\sim 23^{\circ}\text{C}$ manteniendo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h con agua y comida *ad libitum*. Posterior al nacimiento, se homogenizó cada camada a un número mínimo de 5 y máximo de 8 crías machos para garantizar que obtuvieran el peso requerido, así como facilitar el adecuado cuidado y atención de la madre hacia las crías.

El modelo experimental se realizó con ratas inmaduras de 10 días PN, con un peso inicial de 20 a 25 g. A partir del día 21 PN, al término del periodo de lactancia, las crías fueron separadas de la madre, manteniéndolas bajo las mismas condiciones de manejo, cuidado y alimentación hasta el término del experimento. Se realizaron los cortes de tiempo: al día 14 PN a las 6 y 24 h post tratamiento con MO y Clbx, al día 30 y 90 PN (Sarkisian y cols., 1997; Hellier y cols., 2005; Kubova y cols., 2012; Yuan-Hao Chen y cols., 2013; Vega-García y cols., 2019).

Todos los procedimientos de uso, manejo y cuidado de los animales fueron aplicados bajo la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y aprobados por el comité de ética e investigación del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepulveda” del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

7.2.1.-Inducción y manejo del modelo de *Status epilepticus* recurrente.

Las crías fueron separadas de la madre a partir del día 10 PN, se colocaron en cajas individuales, con una almohadilla térmica a ~34°C para simular una temperatura similar a la temperatura emitida durante el cuidado materno. Se administró una dosis de 3 mg/Kg de AK (AK monohidratado, Sigma-Aldrich 58002-62-3) i.p., diluido en solución salina (Ben-Ari y cols., 1984;1985; Sarkisian y cols., 1997). Se evaluó la evolución de la conducta motora posterior a la administración de AK por medio de la escala de la evolución de la conducta motora en ratas de 10 a 14 días PN (Fig.6), del inicio de la actividad convulsiva y el establecimiento del *Status epilepticus*, el cual una vez declarado, se mantuvo durante 30 min (Sarkisian y cols., 1997; Hellier y cols., 2005).

La conducta motora de los animales administrados con AK, fue comparada al mismo tiempo con un número igual de animales tratados únicamente con solución salina i.p., los cuales mantuvieron las mismas condiciones de manejo y tiempo de separación materna. Una vez concluido el tiempo de evaluación del *Status epilepticus*, se administró una dosis única de Diazepam (Dzp) de 3 mg/kg i.m., para contener la severidad de la actividad convulsiva. Posteriormente, las ratas fueron colocadas nuevamente con la madre para su estimulación y

alimentación. Se estandarizo un tiempo máximo de separación materna de 90 min, tiempo requerido para el desarrollo y evaluación del modelo de *Status epilepticus*, el cual se repitió cada 24 h, durante cinco días, del día 10 al 14 PN (Fig.7) (Stafstrom y cols., 1993; Jarvela y cols., 2008; Kubová y cols., 2012).

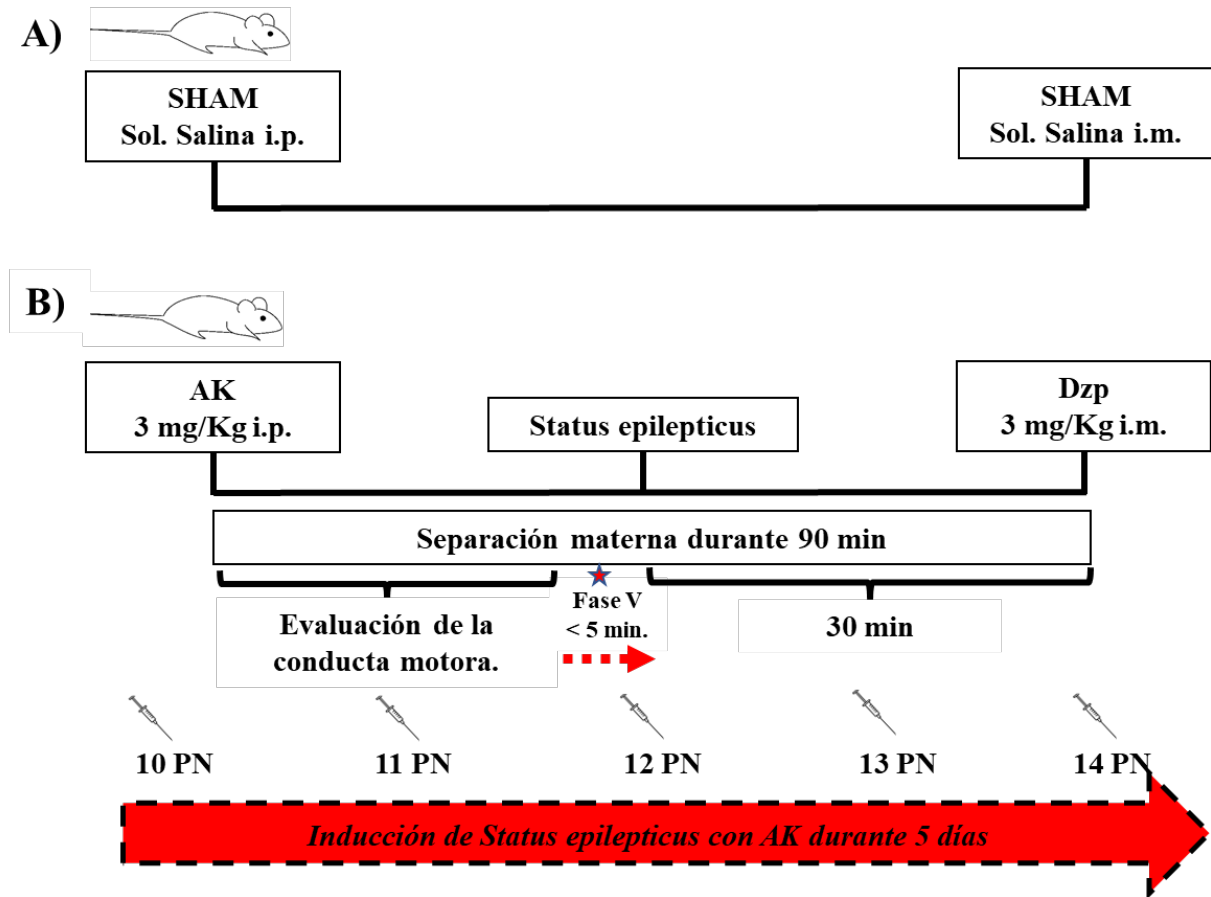


Fig. 7. Modelo de *Status epilepticus* recurrente. A) grupo AK (ácido kaínico): administración i.p. de ácido kaínico (AK) y evaluación de la conducta motora, donde la estrella en color rojo indica el inicio de la Fase V, correspondiente al establecimiento de un *Status epilepticus*, el cual se mantuvo durante 30 min y posterior al tiempo de evaluación, la administración de Diazepam (DZP) i.m. B) grupo SHAM: administración de solución (sol.) Salina i.p. y al término del tiempo de evaluación de la conducta motora, la administración i.m. Este procedimiento se repitió durante 5 días (a partir del día 10 al día 14 PN).

7.2.2- Escala de evaluación de la conducta motora propia del *Status epilepticus* inducido por AK en ratas inmaduras.

La escala de evaluación se estandarizó en un modelo de *Status epilepticus* inducido por AK, dentro del periodo de desarrollo del día 10 al día 14 PN, se registró el comportamiento de cada con conducta observada posterior a la administración intraperitoneal de 3 mg/kg de AK. (Ben Ari y cols., 1981; Albalá y cols., 1984; Cherubini y cols., 1983; Tremblay y cols., 1984; Heller y cols., 2005; Velíšková y cols., 1988; Dzhala y cols., 2005; Raol y cols., 2009; Moreira y cols., 2011; Zayachivsky y cols., 2012; Vega-García y cols., 2019), estableciéndose las siguientes fases:

- ✓ **Fase I.-** No hay respuesta a estímulos.
- ✓ **Fase II.-** Movimientos espasmódicos, sacudidas, estiramientos del tren posterior extensión de cola.
- ✓ **Fase III.-** Movimiento de rascado unilateral con extremidad inferior y posición sobre su costado, involucrando cualquiera de las dos extremidades inferiores de forma independiente.
- ✓ **Fase IV.-** Movimiento de rascado bilateral, con extremidades inferiores involucrando cualquiera de las dos extremidades de forma independiente, con recuperación de la postura.
- ✓ **Fase V.-** Mioclonías de las cuatro extremidades con pérdida de la postura sin recuperación de la misma.

(Fase I y Fase II son visibles de forma individual durante el día 10, 11 y 12 PN; a partir del día 12 PN se observan integrados a movimientos repetitivos de acicalamiento, olfacción y bostezos previos al movimiento de rascado unilateral con extremidad inferior y posición sobre su costado (Fase III) (Ben Ari y cols., 1981; Tremblay y cols., 1984) Se declara la presencia de Status epilepticus al observar la presencia de la Fase V por un tiempo mayor a los 5 min, sin recuperación de la función normal entre crisis (Sarkisian y cols., 1997; Lowenstein y cols. 1999; Zayachkivsky y cols., 2011) (**Fig. 6**).

7.2.3.-Tratamientos control y experimental post modelo de *Status epilepticus* recurrente.

A partir del día 14 PN (post modelo de *Status epilepticus* recurrente), se obtuvo una n=100 ratas, divididos en cuatro grupos, tres grupos control: SHAM y AK los cuales recibieron solución salina v.o y AK-Clbx, que recibió tratamiento con Celecoxib 20 mg/Kg diluido en carboximetilcelulosa-sodio al 0.5% (Sodium-carboxymethylcellulose, Sigma Aldrich 419273) (Celecoxib se obtuvo de Parafarm-Laboratory, México) y un grupo experimental: AK-MO que recibió tratamiento con 300 mg/Kg de MO (se obtuvo de cápsulas vegetales de extracto de MO de Smart, City, SA. Luxemburgo), diluido en polietilenglicol al 20% (poly-ethylene glicol, Sigma Aldrich P3015) se determinó las concentraciones de honokiol y magnolol, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un detector de matriz de fotodiodos Waters 996 y software Millenium versión 4.0, obteniendo un 90% de honokiol y magnolol. (Kunz y cols., 2001; Kawaguchi y cols., 2005; Martínez y cols., 2006; Orozco-Suárez y cols., 2007; Gong y cols., 2009; Morales-Sosa y cols., 2018; Vega-García y cols., 2019).

7.3- Técnicas de análisis.

7.3.1- Western blot.

- **Obtención de tejido y extracción de proteínas:**

Cada subgrupo fue sacrificado por decapitación a las 6 y 24 h. Se obtuvo el cerebro por craneotomía y se diseccionó la región de hipocampo, el tejido fue clasificado según el grupo correspondiente y almacenado a -70°C hasta su procesamiento. Posteriormente, se realizó una extracción de proteínas, empleando buffer de lisis adicionado con inhibidores de proteasas (Ripa Buffer 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM cloruro de sodio, 1.0% Thermo Fisher Scientific (NP-40 (CA-630) Sigma Aldrich), 0.25%, desoxicolato de sodio, EDTA 1Mm, Inhibidores de proteasas, Cocktail Complete sin EDTA, Roche). Las muestras se centrifugaron durante 35 min a 12.500_{rpm} , a -4°C (Thermo Fisher scientific 75004381).

Posteriormente se obtuvo el sobrenadante de cada muestra y se le realizó la cuantificación de proteínas correspondiente empleando el método Bradford (Bradford Reagent BIORAD). La lectura de las muestras se realizó por espectrofotometría a una longitud de onda de 590 Nm (Precisely, Perkin Elmer), obteniendo los datos de absorbancia para cada muestra en una concentración de $\mu\text{gr}/\mu\text{L}$ utilizando el programa Lambda 25 UV/VIS Spectrometer.

- **Electroforesis:**

Se realizó la electroforesis de 60 µg de proteína de cada muestra, para identificar por peso molecular las proteínas: Cox-2 (70-72 kDa), NFκ-βp50 (50/105 kDa) e iNOS (90 kDa) , IL1-β (31 kDa) y TNF-α (17 kDa, en un SDS-page al 12 y 15% (Bis-acrilamida al 30%; TRIS base 1.5M pH8.8, SDS 10%, H2O destilada), con una porción concentradora al 4% (Bis-acrilamida al 30%; TRIS base 0.5 M pH6.8, SDS 10%)). La electroforesis se realizó durante 2 h/45 min aproximadamente, aplicando una intensidad de corriente de 70 vlts en buffer de corrida (Glicina 0.192 M; SDS 0.1; TRIS base 0.025M pH 8.3, BioRad).

Posterior al tiempo de la electroforesis, se realizó la transferencia húmeda de las proteínas separadas por peso molecular (Mini Trans-Blot Central Core, Bio-Rad Laboratories, USA) a una membrana de nitrocelulosa de 45 µm (Bio-Rad Laboratories, USA) utilizando buffer de transferencia (glicina 0.192 M; TRIS base 0.025 M, BioRad; Metanol 20% J.T. Baker), durante 3 h, aplicando una intensidad de corriente de 90 vlts. Posterior al tiempo de transferencia, se realizaron dos lavados de 5 min a cada membrana con PBS 0.15 M (NaCl 0.136 M; KCl 2.7 mM; Na₂HPO₄ 6.5 mM; K₂HPO₄ 1.5 mM; pH 7.2, J.T.Baker), se bloquearon sitios inespecíficos con leche Svelty diluida en PBS-Tween (PBS 0.15 M + 0.1-Tween 20 %, BioRad) al 10%, previamente filtrada durante 2 h, después del tiempo de bloqueo, cada membrana se incubo en anticuerpo (ac) primario correspondiente a su proteína problema, durante 24 h. Posterior al tiempo de incubación del ac primario, se realizaron tres lavados de 5 min cada uno, con PBS-Tween y se colocó el anticuerpo secundario correspondiente a cada proteína durante 2 h.

Se emplearon los siguientes ac primarios a una dilución de 1 μ L:1000 μ L: anti Cox-2 (sc-376861 mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology) y anti NF κ - β p50 (sc-7178- rabbit policlonal, Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1 μ L: 1000 μ L PBS-Tween y 1.5 μ L: 1000 μ L PBS-Tween respectivamente, anti IL1- β (sc-12742 mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology) y anti TNF- α (sc-133192 mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology) anti-iNOS (Pan-NOS sc-58399 mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1 μ L: 1000 μ L y como proteína control se empleó β -Actina (sc-47778 anti-mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology)

Posterior al tiempo de incubación del ab secundario, se realizaron se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con PBS-Tween y 2 con PBS. Se emplearon los siguientes ac secundarios: anti-mouse IgG-HRP (VECTOR Lab) en el caso de Cox-2, TNF- α y IL1- β y β -Actina, para NF κ - β p50 anti- rabbit-IgG-HRP (VECTOR Lab), a una dilución de 1 μ L: 10.000 μ L de PBS-Tween durante 2 h. Finalmente, cada membrana fue revelada por quimioluminiscencia (Luminata Crescendo Western HRP, Millipore), utilizando el equipo foto documentador Fusion FX Vilber Lourmat.

Se realizó un análisis de densidad de volumen por medio del programa software Quantity One de Bio-Rad. Los datos obtenidos del análisis de densidad de cada proteína problema (VDI) fueron normalizados con los datos de su correspondiente proteína control (V) y se reportaron en valores de densidad integrado (VDI/V).

7.3.2.- Análisis por inmunohistoquímica.

- **Obtención de tejido:**

Al término de la evaluación del UPD y el EEG, las ratas fueron administradas con una dosis letal de pentobarbital i.p., y se perfundieron vía intracardiaca con solución salina (8%) seguido de paraformaldehído al 4% más glutaraldehído al 1%. El encéfalo se obtuvo por craneotomía y se mantuvo en post fijación por 72 h más, a 4°C. Posteriormente, los tejidos fueron procesados e incluidos en parafina y se realizaron cortes coronales de 6 µm a nivel de hipocampo dorsal y ventral, por medio de un micrótopo (LEICA RM2125RT Germany). Los cortes fueron colocados en serie de 5 cortes por laminilla previamente tratadas con poly-L-lisine (Sigma Aldrich).

- **Inmunohistoquímica:**

Los tejidos fueron previamente desparafinados e hidratados con alcoholes decrecientes hasta llegar a agua. Se realizó la recuperación de antígenos empleando el buffer DIVA (DIVA reagent Biocare Medical, CA, USA) en una olla de presión durante 20 min. Posteriormente se realizaron lavados de 10 min con PBS-Tritón a un pH de 7.2-7.6 (PBS-Buffer de fosfatos 0.12M más Tritón 0.1% Sigma Aldrich); 5 min con PBS con un pH de 7.2-7.6 (PBS-buffer de fosfatos 0.12 M); se inhibió la peroxidasa endógena con peróxido de hidrogeno (0.5% H₂O₂ Sigma Aldrich) por 15 min; se realizaron 2 lavados con PBS-T y se bloquearon los sitios inespecíficos con suero normal bovino (1 µL: 200 µL en PBS, pH 7.2 - 7.6 (VECTOR Lab,USA)) durante 30 min. Se incubó el tejido con anti-NeunN (antígeno nuclear neuronal (MAB-377, Millipore) a

una dilución de 1:200 PBS 0.12 M durante 48 h a 4°C y anti-GFAP (GFAP-Dako Denmark A/S) a una dilución de 1:500 PBS 0.12 M durante 24 h a 4°C. Posteriormente, se retiró el exceso de anticuerpo primario por medio de dos lavados con PBS cada uno durante 5 min, se incubó el tejido con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG-peroxidasa (PI-200, VECTOR Lab, USA) para Neun N y anti-rabbit IgG-peroxidasa PBS a una dilución 1 µL: 300 µL para GFAP, durante 3 h, se retiró el exceso de anticuerpo secundario realizando dos lavados más con PBS. El tejido fue revelado con DAB (DAB Chromogen kit DB801L, Biocare Medical, CA, USA) y se realizó un último lavado con agua destilada durante 5 min más (los cortes procesados para GFAP fueron contrastados con Hematoxilina de Harris) finalmente, los cortes fueron nuevamente deshidratados y montados con resina sintética Entellan (Merck Millipore).

7.3.3.- Método de conteo fraccionario de West.

Los cortes fueron observados por medio de un microscopio de luz (Axiolab HBO 5.0, Carl Zeiss), con cámara refrigerante (Evolution MP cooler 5.0 RTV) y el analizador de imagen Pro Plus 7 (Media Cybernetics). El número de neuronas inmunorreactivas a Neun N fue cuantificado a través del método fraccionario West (West y cols.,1993), el cual consiste en contar neuronas en disectores ópticos de una muestra sistemáticamente uniforme que constituye una fracción del volumen de la región cerebral analizada. Los cortes se montaron en serie y se analizó un corte de 6 µm por cada serie, cada 35 micras obteniéndose un total de 5 series, con lo cual se determinó la fracción de muestreo (ssf) 1/5. Para determinar el valor del área (cuadro)/área (x, y) o asf, se tomó la fracción de volumen de cada área del hipocampo que

corresponde al área de conteo (220 x 180µm), dato que incluye la amplificación de la cámara y finalmente se calculó el número de neuronas en la fracción de volumen mediante la siguiente fórmula: $N = \sum Q \cdot t/h \cdot 1/ssf \cdot 1/ssf$. El valor de h corresponde a la altura del disector, siendo relativo al espesor del corte (t), h/t, mientras Q- es el número de neuronas en una fracción de volumen conocida de cada área del hipocampo. Con el propósito de estandarizar el conteo, se usó la misma fracción de volumen para cada grupo control y experimental (West y cols., 1993).

7.3.4.-Técnica quirúrgica para implante de electrodo bipolar en CA1 de hipocampo ventral.

Se realizó el implante de un electrodo bipolar en el hipocampo ventral derecho al 80 PN. Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de Ketamina (100 mg/kg, i.m.) y Xilacina (20 mg/kg, i.m.) y por medio de cirugía estereotáxica, se realizó el implante del electrodo bipolar en la región de CA1 en hipocampo ventral, utilizando las siguientes coordenadas a partir de Bregma: antero-posterior (AP) -5.3; lateral (L) -5.2; profundidad (P) -7.5 (Paxinos y Watson y cols., 1998). Posteriormente, se colocaron 4 tornillos de acero quirúrgico inoxidable en referencia a la corteza frontal y occipital. El electrodo se sujetó por medio de un alambre de cobre al tornillo frontal derecho, los tres tornillos restantes fueron colocados con la finalidad de proporcionar estabilidad al implante, el cual fue fijado con acrílico dental. Las ratas mantuvieron un periodo de recuperación post quirúrgica de 7 días, durante el cual recibieron tratamiento con penicilina G benzatina i.m. durante 3 días (Rosillo-de la Torre y cols., 2015; Santana-Gómez y cols., 2015)

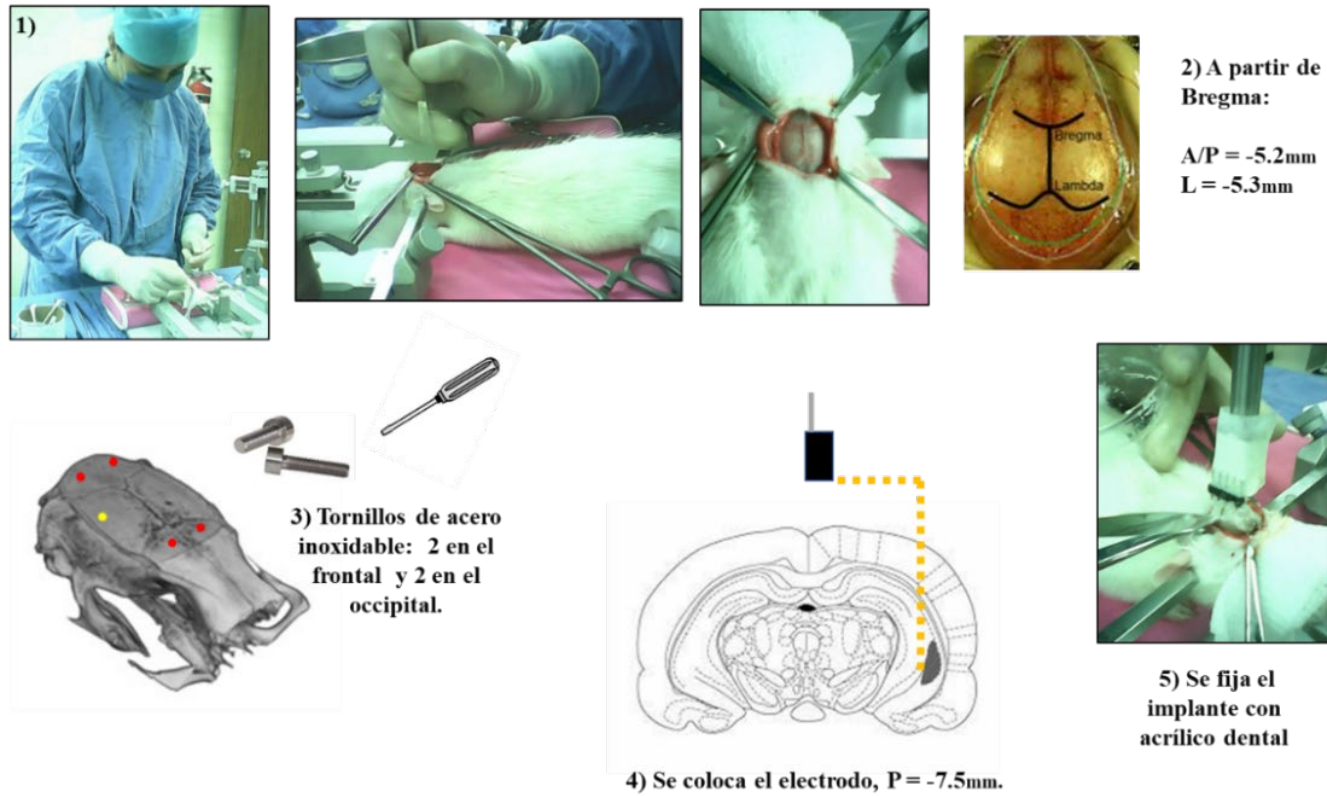


Fig. 7. Técnica de microcirugía empleada para realizar el implante de un electrodo bipolar en el hipocampo ventral: **1)** Rata en marco estereotáxico y localización de las suturas Bregma y Lambda. **2)** Coordenadas a partir de Bregma antero-posterior (A/P): -5.2, lateral (L): -5.3, para localizar el hipocampo ventral. **3)** Colocación de tornillos quirúrgicos sobre el hueso frontal y occipital como soporte para el implante. **4)** Colocación del electrodo en la región CA1 de hipocampo ventral, profundidad (P): -7.5. **5)** Recubrimiento de acrílico dental, para fijar el electrodo.

7.3.5.- Determinación del umbral post descarga.

El umbral post descarga (UPD), se define como la intensidad de microamperes (μA) mínima necesaria para generar una post descarga de 3 seg de duración, observada de forma conductual como un guiño ipsilateral al sitio del implante o un cambio en el registro electroencefalográfico. Esta herramienta, nos permite determinar qué tan excitable es el hipocampo bajo condiciones basales o experimentales. En el presente estudio, la evaluación de UPD se realizó mediante la aplicación una serie de pulsos eléctricos; de tipo rectangulares con una intensidad de 60 Hz y 1 ms de duración en intervalos de 1 min, la estimulación se inició con una intensidad de 10 μA , incrementándola en un 20% entre cada estímulo hasta observar una post descarga en el registro electroencefalográfico, un guiño ipsilateral al sitio del implante o cambio conductual evaluado mediante la escala de Racine modificada (Racine 1972). La duración de la post descarga y la actividad electroencefalográfica fue registrada por medio del programa de registro GRASS PolyVIEW, Astro-Med. Inc. (Cramer y cols., 1998; Rosillo-de la Torre y cols., 2015; Santana-Gómez y cols., 2015).

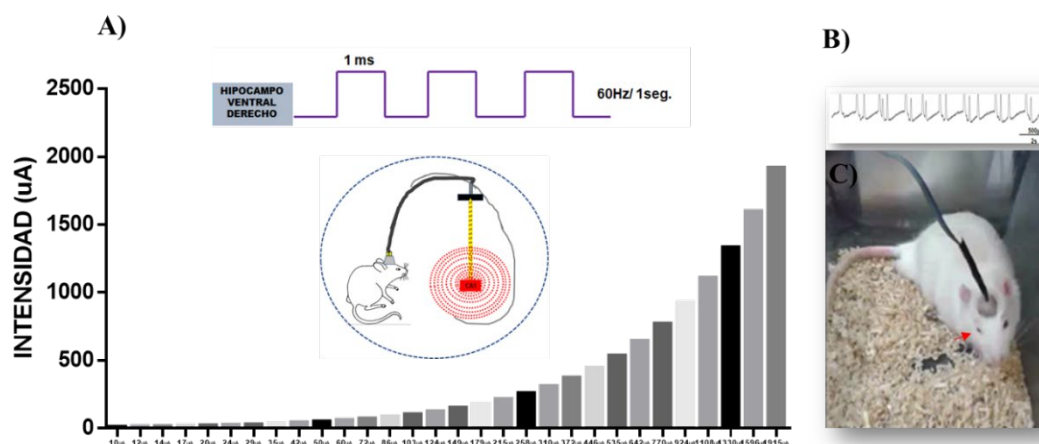


Fig. 8. Determinación del umbral post descarga o UPD: **A)** Estímulos eléctricos escalonados (cada minuto), iniciando con una intensidad de corriente de 10 μA , aumentando la intensidad un 20% entre cada estímulo. **B)** Cambio en el registro electroencefalográfico (post descarga con duración de 3 seg.). **C)** Cambio conductual: guiño ipsilateral al sitio del implante.

7.3.5.1.- Escala modificada de evaluación de la conducta motora de Racine.

- Fase I.- Guiño ipsilateral y sacudidas de perro mojado.
- Fase II.-Masticaciones, movimientos faciales y de Cabeza.
- Fase III.- Clónus de miembros anteriores.
- Fase IV.- Posición de canguro.
- Fase V.- Pérdida de la postura y clónus de miembros anteriores.

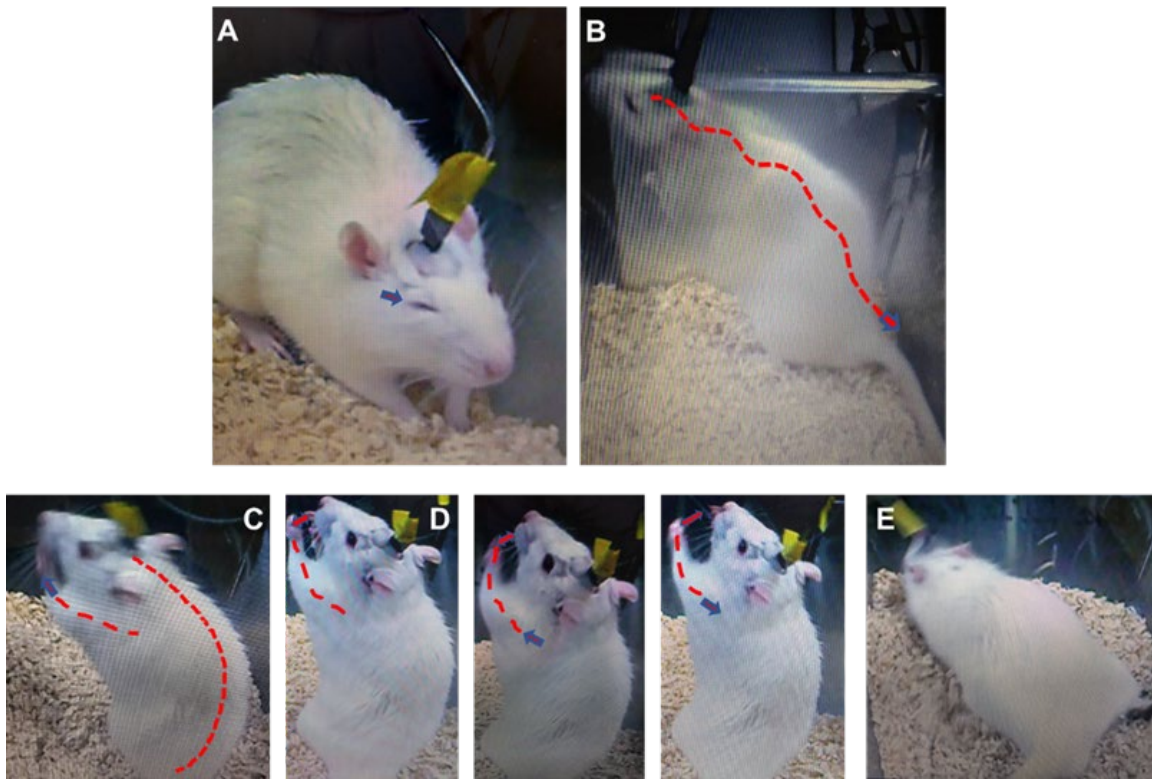


Fig. 9. Escala de Racine (al día 90PN): **A)** Guiño ipsilateral; **B)** Sacudidas de perro mojado; **C)** Posición de canguro; **D)** Clónus de miembros anteriores; **E)** Pérdida de la postura (Racine 1972).

7.3.6.- Evaluación de la actividad electroencefalográfica en hipocampo ventral.

La evaluación de la actividad electrográfica se realizó en condiciones basales (tiempo basal) y posterior a la determinación del umbral post descarga (tiempo post UPD) por medio de un amplificador modelo P511(Grass Technologies, West Warwick, RI). La señal fue amplificada por medio de un filtro pasa-banda de 0.1-100 Hz digitalizando 1000/muestras/seg. Se realizó el análisis de los datos obtenidos en tiempo basal y a los 2 min post UPD, se tomó 1 min de cada periodo para el análisis por medio de las transformadas de Fourier (FFT), por lo que los valores de potencia correspondientes a las diferentes bandas fueron contrastados con el valor de poder máximo de cada banda analizada (0.1-4 Hz delta,4-8 Hz teta,8-13 Hz alfa,13-30 Hz beta y 30-90 Hz gamma). El análisis de la actividad electroencefalográfica se realizó con un software desarrollado en el departamento de investigación en neurociencias del instituto de psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñis”, México (Valdés-Cruz y cols., 2012; Santana-Gómez y cols., 2017).

8.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

- **Etapa inmadura.**

Para el análisis de los datos obtenidos por Western blot se empleó un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey con un criterio de significancia de $p < 0.05$.

El análisis de los datos obtenidos por inmunohistoquímica con NeuN y GFAP, de los subcampos CA1, CA3, GD e hilus de hipocampo dorsal y ventral, en los grupos control y experimental se realizó un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey con un criterio de significancia de $p < 0.05$. Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar (DE). Los cambios en los valores de los grupos control y experimental, se reportaron en porcentaje.

- **Etapa adulta.**

Para el análisis estadístico de los valores del UPD y para el análisis por frecuencias de los espectros de poder obtenidos por EEG en los diferentes grupos de tratamiento, se realizó un ANOVA de una vía seguida de la post prueba de comparación múltiple entre grupos de Bonferroni's, con un criterio de significancia $p < 0.05$.

Para el análisis por inmunohistoquímica con Neu N de los subcampos CA1, CA3, GD e hilus de hipocampo dorsal y ventral, en los grupos control y experimental se empleó un

ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni's, con un criterio de significancia de $p < 0.05$. Los datos obtenidos se presentan como el promedio \pm error estándar (EE). Los cambios en los valores de los grupos control y experimental, se reportaron en porcentaje.

9.- RESULTADOS POR OBJETIVOS PARTICULARES.

1.- Evaluar el efecto antiinflamatorio de la MO post modelo de Status epilepticus recurrente inducido por AK, en ratas macho de la cepa Sprague Dawley al día 14 PN.

A) Modelo de Status epilepticus recurrente:

B) Tratamientos control y experimental:

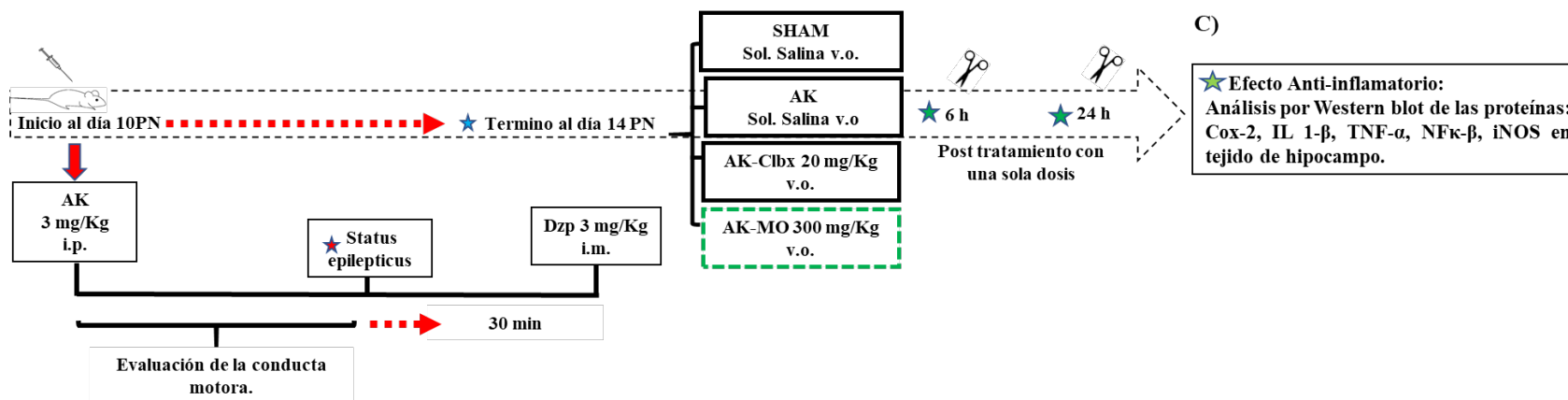


Fig. 10. Evaluación del efecto antiinflamatorio de la MO: A) Modelo de *Status epilepticus* recurrente inducido con ácido kaínico (AK) i.p. y contenido 30 min después con Diazepam (Dzp) i.m. B) Tratamientos control y experimental con una dosis única: SHAM-solución (Sol.) salina v.o., AK (ácido kaínico)- sol. salina v.o., AK-MO (*Magnolia officinales*), AK-Clbx (Celecoxib). C) cortes de tiempo a las 6 y 24 h post tratamiento control y experimental para evaluar el efecto antiinflamatorio por medio de la técnica de Western blot, para cuantificar la expresión de las proteínas: Cox-2, IL 1-β, TNF-α, NFκ-β e iNOS, en tejido de hipocampo.

1.1.- Cuantificar la expresión de las proteínas pro inflamatorias: IL1- β , Cox-2, iNOS, NF κ - β y TNF- α ; por medio de la técnica Western blot en hipocampo, posterior al modelo de *Status epilepticus* recurrente, a las 6 y 24 h post tratamiento con y sin MO.

- **IL1- β :**

En la evaluación a las 6 h post tratamiento, los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron una disminución en la expresión de la IL1- β , con una diferencia significativa de $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$ respectivamente, en comparación con el grupo AK. En la evaluación a las 24 h post tratamiento, ambos grupos AK-MO y AK-Clbx, mostraron una disminución en la expresión de la IL1- β , con una diferencia significativa de $*p < 0.01$ y $***p < 0.001$ respectivamente, en comparación con el grupo AK. No se observaron diferencias significativas entre los grupos AK-MO y AK-Clbx a las 24 h post tratamiento. Por otra parte, los grupos, AK, AK-MO y AK-Clbx mostraron mayor expresión de la IL1- β con una diferencia significativa $****p < 0.0001$ respectivamente a las 6 y 24 h post tratamiento en comparación con el grupo SHAM (Fig. 11, A).

- **Cox-2:**

Los grupos AK-MO y AK-Clbx a las 6 h post tratamiento, mostraron una disminución en la expresión de Cox-2, con una diferencia significativa $*p < 0.013$ y $***p < 0.001$ respectivamente, en comparación con el grupo AK. De la misma forma, en la evaluación a las 24 h post tratamiento, los grupos AK-MO y AK-Clbx mantuvieron una disminución de Cox-2, con una diferencia significativa $*p < 0.01$ en comparación con el grupo AK.

El grupo AK mostró mayor expresión de Cox-2 con una diferencia significativa $***p < 0.001$ a las 6 y 24 h post tratamiento en comparación con el grupo SHAM. De igual forma los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron un incremento en la expresión de Cox-2 a las 6 y 24 h, con una diferencia significativa $**p < 0.001$, en comparación con el grupo SHAM (Fig. 11, B).

- **iNOS:**

El análisis a las 6 h post tratamiento los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron una disminución en la expresión de iNOS, con una diferencia significativa $**p < 0.01$ en comparación con el grupo AK. No obstante, a las 24 h post tratamiento, el grupo AK-MO no mostró diferencias significativas en comparación con el grupo AK, solo el grupo AK-Clbx mantuvo una diferencia significativa $*p < 0.04$ en comparación con el grupo AK. Ambos grupos, AK-MO y AK-Clbx mostraron mayor expresión de iNOS, con una diferencia significativa $***p < 0.0001$ en comparación con el grupo SHAM a las 6 y 24 h post tratamiento (Fig. 12, C).

- **NFκ-βp50:**

La expresión de NFκ-βp50 en los grupos AK-MO y AK-Clbx a las 6 h post tratamiento, no muestran diferencias significativas en comparación con el grupo AK. El grupo AK-Clbx a las 24 h post tratamiento mostró una disminución de NFκ-βp50 con una diferencia significativa $***p < 0.001$ en comparación con los grupos AK y AK-MO. No obstante, ambos grupos AK y AK-Clbx mantienen un incremento en la expresión de NFκ-βp50, con una diferencia

significativa **** $p < 0.0001$ y *** $p < 0.001$ respectivamente, en comparación con el grupo SHAM (Fig.12, D).

- **TNF- α :**

La expresión de TNF- α los grupos AK-MO y AK-Clbx a las 6 h post tratamiento, no muestran diferencias significativas con el grupo AK. El grupo AK-MO mostró mayor expresión de TNF- α a las 6 h con una diferencia significativa * $p < 0.02$ en comparación con el grupo AK-Clbx. No obstante, en la evaluación a las 24 h post tratamiento, los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron una disminución en la expresión de TNF- α , con una diferencia significativa ** $p < 0.02$ y **** $p < 0.0001$ respectivamente, en comparación con el grupo AK, de igual forma el grupo AK-Clbx mostró menor expresión de TNF- α , con una diferencia significativa * $p < 0.03$ en comparación con el grupo AK-MO. No obstante, ambos grupos AK, AK-MO y AK-Clbx mostraron un incremento en la expresión de TNF- α , con una diferencia significativa **** $p < 0.0001$ en comparación con el grupo SHAM (Fig.13, E).

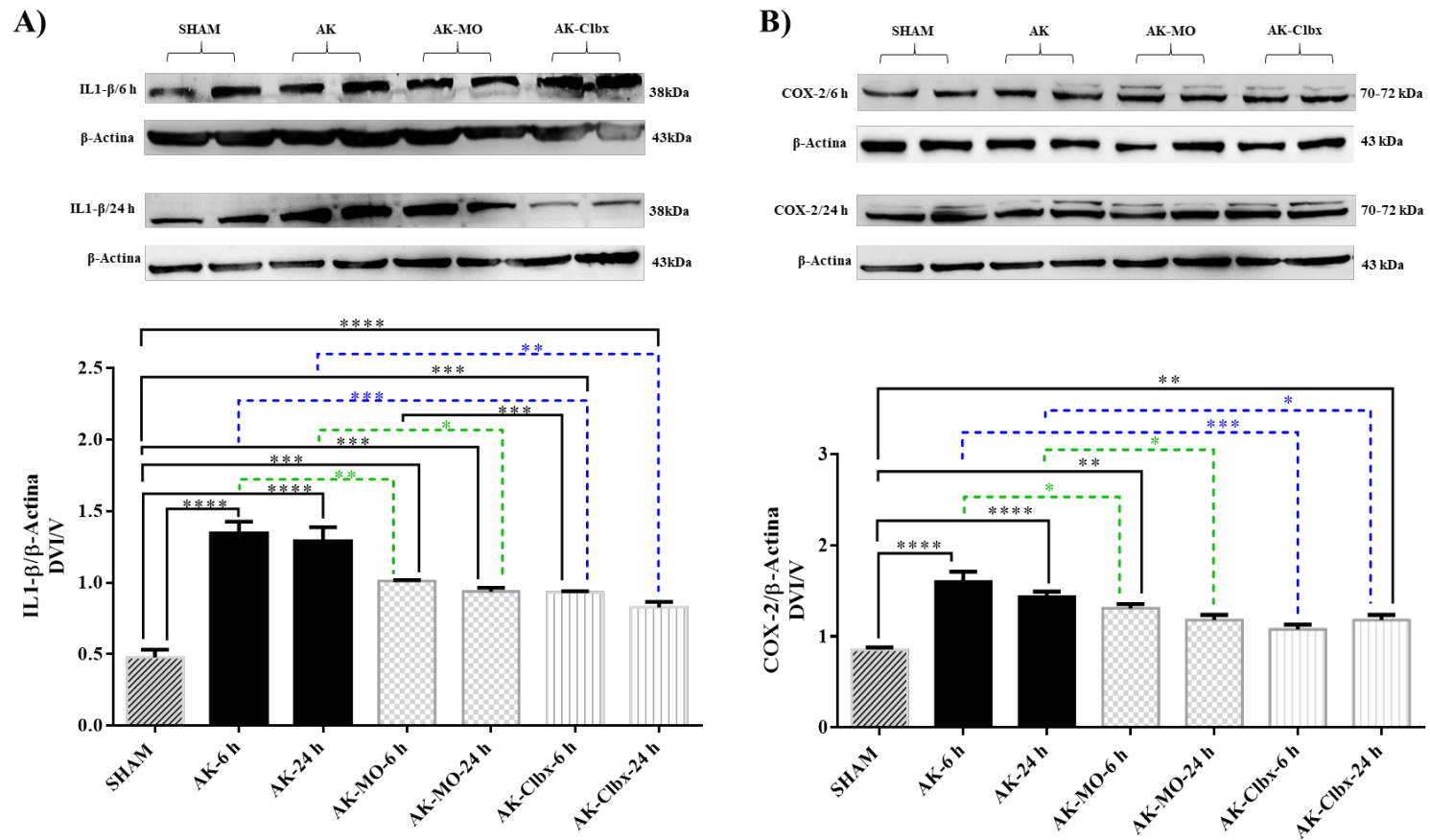


Fig. 11. Expresión de las proteínas proinflamatorias IL1-β, Cox-2, en tejido del hipocampo. Gráficas que muestran el promedio ± desviación estándar (DE) a las 6 h y 24 h post tratamiento control y experimental. A) IL1-β: los grupos AK-MO y AK-Clbx a las 6 h, mostraron una disminución en la expresión de IL1-β, con una diferencia significativa $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$ respectivamente. A las 24 h, los grupos AK-MO y AK-Clbx mantuvieron una disminución de IL1-β con una diferencia significativa $*p < 0.01$ y $***p < 0.001$ respectivamente, en comparación con el grupo AK. B) Cox-2: los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron a las 6 h, una disminución en la expresión de Cox-2, con una diferencia significativa $*p < 0.013$ y $***p < 0.001$ respectivamente y a las 24 h, los grupos AK-MO y AK-Clbx mantuvieron una disminución de Cox-2 con una diferencia significativa $*p < 0.01$ en comparación con el grupo AK.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba Tukey, $p < 0.05$.

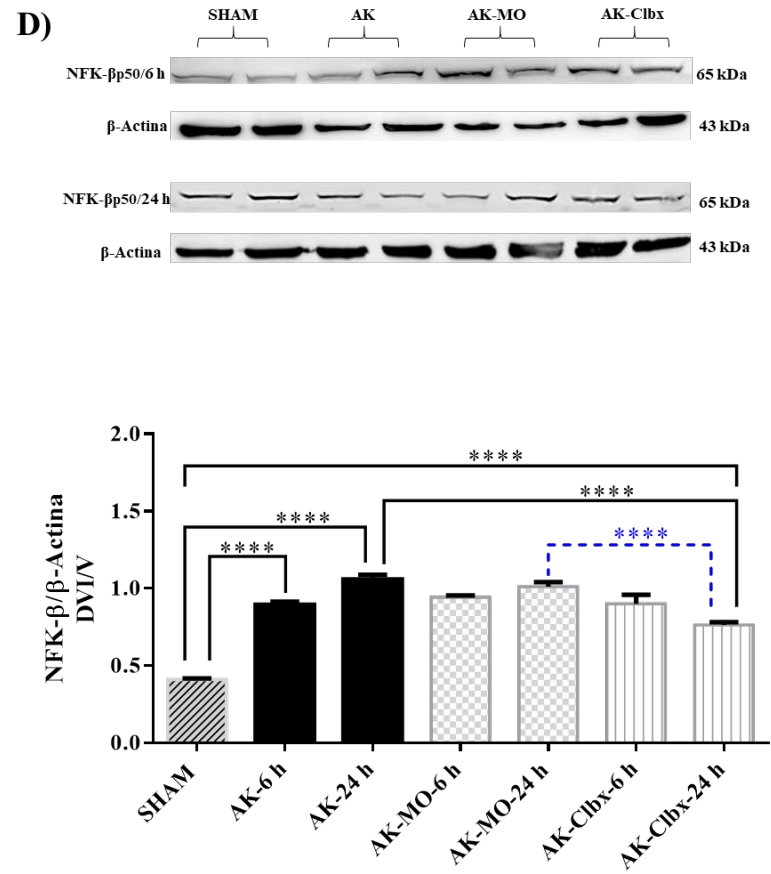
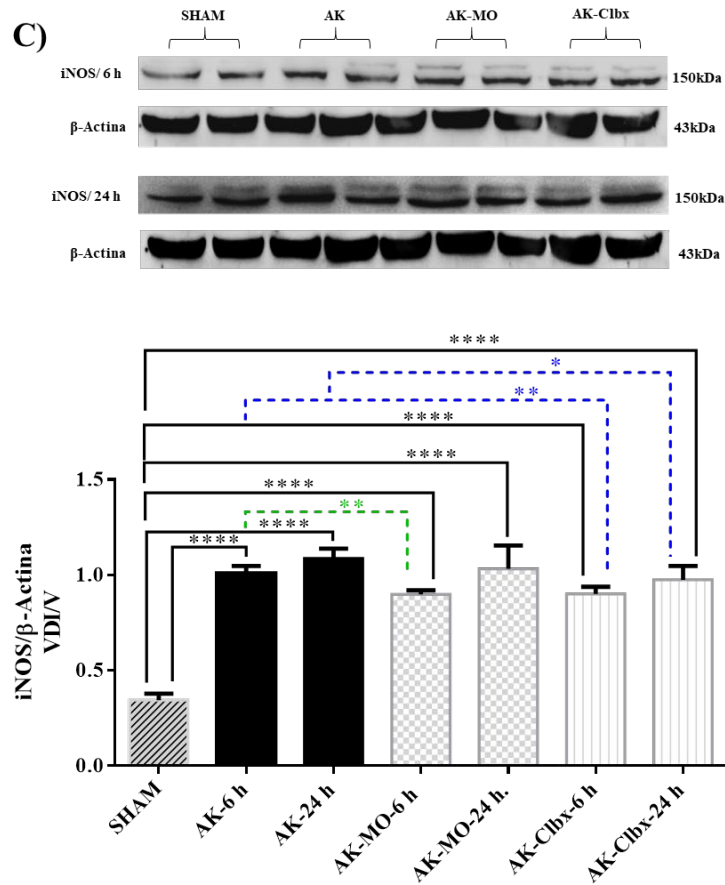


Fig. 12. Expresión de las proteínas proinflamatorias iNOS y NF κ - β en tejido de hipocampo. Gráficas que muestran el promedio \pm desviación estándar (DE) a las 6 h y 24 h post tratamiento control y experimental. C) iNOS: los grupos AK-MO y AK-Clbx a las 6 h, muestran una disminución en la expresión de iNOS, con una diferencia significativa $**p < 0.01$ en comparación con el grupo AK. No obstante, a las 24 h post tratamiento, el grupo AK-MO no muestra diferencias significativas en comparación con el grupo AK, solo el grupo AK-Clbx mantuvo una disminución de iNOS con una diferencia significativa $*p < 0.04$ en comparación con el grupo AK. D) NF κ - β 50: los grupos AK-MO y AK-Clbx a las 6 h, no muestra diferencias significativas en comparación con el grupo AK. Solo el grupo AK-Clbx mostró una disminución de NF κ - β 50 a las 24 h post tratamiento, con una diferencia significativa $***p < 0.001$, en comparación con los grupos AK y AK-MO.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba Tukey, $p < 0.05$.

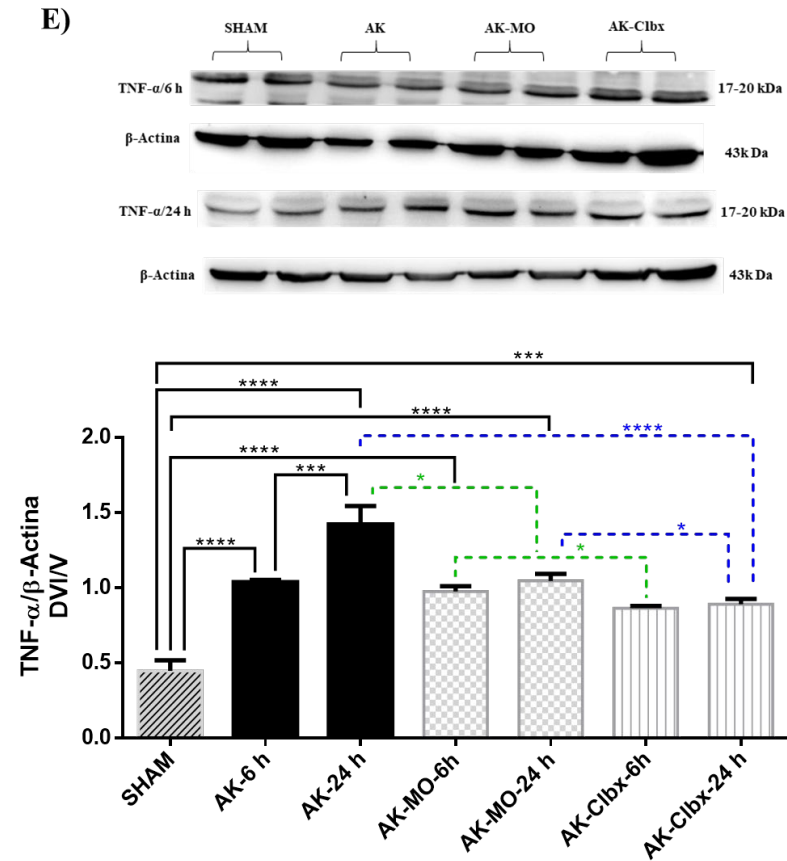


Fig. 13. Expresión de la proteína proinflamatoria TNF-β, en tejido del hipocampo. Gráfica que muestra el promedio ± desviación estándar (DE) a las 6 y 24 h post tratamiento control y experimental. E) TNF-α: los grupos AK-MO y AK-Clbx no muestran diferencias significativas en comparación con el grupo AK a las 6 h post tratamiento, no obstante, el grupo AK-Clbx mostró una disminución en la expresión de TNF-α en comparación con el grupo AK-MO con una diferencia significativa $*p < 0.02$ entre grupos. En la evaluación a las 24 h post tratamiento, los grupos AK-MO y AK-Clbx, muestran una disminución en la expresión de TNF-α, con una diferencia significativa $*p < 0.02$ y $****p < 0.0001$ respectivamente, en comparación con el grupo AK, así mismo se observó una diferencia significativa $*p < 0.03$ entre los grupos ambos grupos.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba Tukey, $p < 0.05$.

2.- Evaluar el efecto neuroprotector de la MO en hipocampo al día 30 PN (16 días post modelo de *Status epilepticus* recurrente).

A) Modelo de Status epilepticus recurrente:

B) Tratamientos control y experimental:

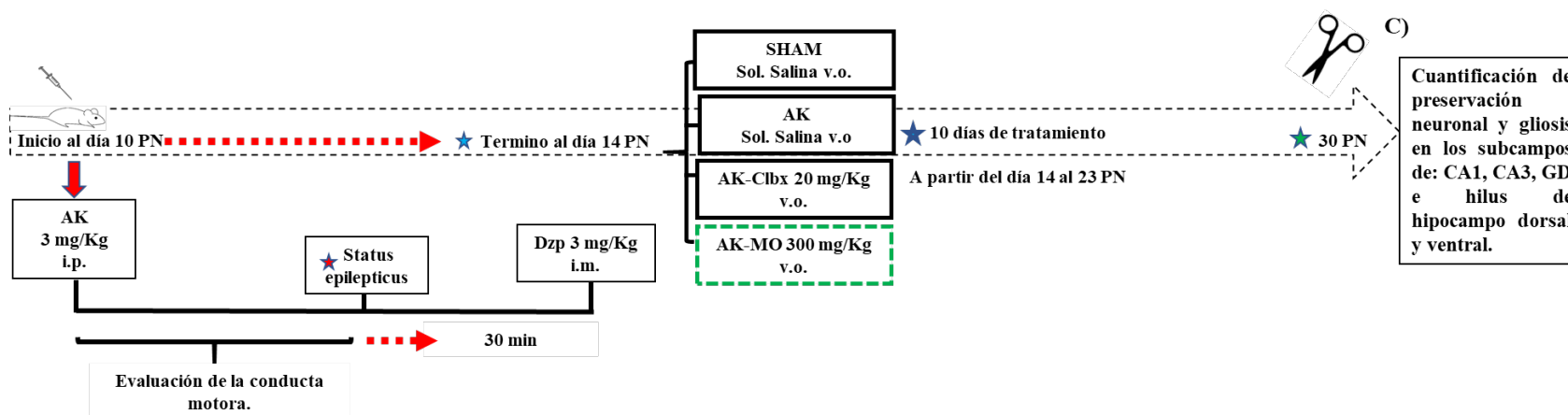


Fig. 14. Diseño experimental para la evaluación del efecto neuroprotector del tratamiento subcrónico con MO (*Magnolia officinalis*): A) Modelo de *Status epilepticus* recurrente inducido con ácido kaínico (AK) i.p. y contenido 30 min después con Dzp (Diazepam) i.m. B) Tratamientos control y experimental: SHAM-solución (Sol.) salina v.o., AK (ácido kaínico)- sol. salina v.o., AK-MO (*Magnolia officinalis*), AK-Clbx (Celecoxib) durante 10 días (a partir del día 14 al 23 PN). C) Corte de tiempo al día 30PN para cuantificar la preservación neuronal y gliosis, empleando la técnica de inmunohistoquímica por marcaje con Neun N y GFAP, en las regiones de CA1, CA3, GD e hilus de hipocampo dorsal y ventral.

2.1.- Cuantificar el número de neuronas preservadas en las regiones de CA1, CA3, GD e hilus de hipocampo dorsal y ventral, por medio de la técnica de inmunohistoquímica por marcaje con Neun-N, en los grupos con y sin tratamiento subcrónico con MO.

- **Hipocampo Dorsal:**

En el área CA1, el grupo AK-MO mostró un mayor número de neuronas inmunorreactivas a Neun N, en comparación con los grupos AK y AK-Clbx, con una diferencia significativa $***p < 0.001$ y $*p < 0.01$, con un porcentaje de cambio de 32.4% y 22% respectivamente. No obstante, los grupos AK y AK-Clbx no mostraron diferencias significativas, aunque mantienen un porcentaje de cambio del 18%, entre ellos. Así mismo, los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron menor preservación neuronal con una diferencia significativa $***p < 0.0001$ y $****p < 0.0001$, con un porcentaje de cambio de 35% y 47.5% respectivamente en comparación con el grupo SHAM (Fig.15, A).

A nivel del área CA3, los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron mayor número de neuronas preservadas, con una diferencia significativa $**p < 0.031$ y $**p < 0.02$ y un porcentaje de cambio de 20.5% y 12% respectivamente en comparación con el grupo AK. El grupo AK-MO mostró mayor preservación neuronal con una diferencia significativa $****p < 0.0001$ y un porcentaje de cambio de 30% en comparación con el grupo AK-Clbx. No obstante, los grupos AK y AK-Clbx muestran menor preservación neuronal con una diferencia significativa $****p < 0.0001$ y AK-MO $*p < 0.01$ en comparación con el grupo SHAM, con un porcentaje de cambio de 30% y 39.4% y 13% respectivamente (Fig.16, A).

En las regiones de GD e hilus, los grupos AK-MO y AK-Clbx no mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo AK, no obstante, mantienen un porcentaje de cambio de 0.77% y 3% respectivamente, en GD (Fig. 17, A) y de 4.5 y 8.5% en el hilus (Fig. 18, A) con un porcentaje de cambios de 30.4% y 33% respectivamente. Así mismo, se observó menor preservación neuronal, con una diferencia significativa $***p < 0.001$ en comparación con el grupo SHAM.

- **Hipocampo Ventral:**

En el área de CA1 del hipocampo ventral, se observó, mayor número de neuronas preservadas en los grupos AK-MO y AK-Clbx, mostrando una diferencia significativa $***p < 0.001$ con un porcentaje de cambio del 25.1 y 19.61% en comparación con el grupo AK. Adicionalmente, el grupo AK-Clbx, mostró una diferencia significativa $*p < 0.04$ con un porcentaje de cambio de 25.1 en comparación con el grupo SHAM (Fig. 19, A).

En el área CA3, los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron una diferencia significativa $****p < 0.0001$ con un porcentaje de cambio del 35.2 y 34.4 % en comparación con el grupo AK, manteniendo una diferencia significativa $**p < 0.001$ con un porcentaje de cambio 17.7 y 18.7% en comparación con el grupo SHAM (Fig. 20, A).

A nivel del GD, los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron una diferencia significativa $***p < 0.0001$ con un porcentaje de cambio de 23.7 y 24% en comparación con el grupo AK, los grupos AK-MO y AK-Clbx no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo SHAM, manteniendo un porcentaje de cambio de 4.5 y 4.1% respectivamente (Fig. 21, A).

Aunque, a nivel del hilus, no se observan diferencias significativas entre los grupos AK-MO y AK-Clbx, se mantiene un porcentaje de cambio del 14.4 y 9% respectivamente, en comparación con el grupo AK, además de una diferencia significativa $*p < 0.01$ y $***p < 0.0008$, respectivamente en los grupos AK y AK-MO en comparación con el grupo SHAM, con un porcentaje de cambio del 22 y 9%. El grupo AK-Clbx no mostró diferencias significativas en comparación con los grupos AK y SHAM, aunque se observó un porcentaje de cambio de 9% entre ambos grupos (Fig. 22, A).

2.2 Cuantificar el número de células gliales en las regiones de CA1, CA3, GD e hilus de hipocampo dorsal y ventral, por medio de la técnica de inmunohistoquímica por marcaje con GFAP, en los grupos con y sin tratamiento subcrónico con MO.

- **Hipocampo Dorsal:**

Respecto al número de células inmunorreactivas a GFAP en el área de CA1 del hipocampo dorsal, los grupos AK-MO y AK-Clbx no mostraron diferencias significativas respecto al grupo AK, manteniendo un porcentaje de cambio del 5.8% y 11% respectivamente. Los grupos AK, AK-MO y AK-Clbx mostraron mayor número de células inmunorreactivas a GFAP con una diferencia significativa $****p < 0.0001$ y un porcentaje de cambio 58 y 55% respectivamente en comparación con el grupo SHAM (Fig. 15, C).

De la misma forma, en el área CA3 del hipocampo, los grupos AK, AK-MO y AK-Clbx mantienen una diferencia significativa $****p < 0.0001$ con un porcentaje de cambio de 59.5, 52.1 y 55.2% respectivamente, en comparación con el grupo SHAM. No obstante, sólo el

grupo AK-MO presento menor número de células inmunorreactivas a GFAP, con una diferencia significativa $**p < 0.0058$ y un porcentaje de cambio de 15.5 % en comparación con el grupo AK. Aunque, el grupo AK-Clbx no mostró diferencias significativas con respecto al grupo AK, mantiene un porcentaje de cambio del 9.5% (Fig. 16, C).

Por otra parte, en el GD solo el grupo AK-Clbx mostró menor expresión de células inmunorreactivas a GFAP con una diferencia significativa $**p < 0.043$ y un porcentaje de cambio de 8.8% en comparación con el grupo AK. Sin embargo, en los grupos AK, AK-MO y AK-Clbx, se observa una diferencia significativa $****p < 0.0001$ en comparación con el grupo SHAM, con un porcentaje de cambio 61,59.2 y 58.1% respectivamente (Fig. 17, C).

En el hilus del hipocampo dorsal, los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron diferencias significativas $**p < 0.01$ y $****p < 0.0001$ con un porcentaje de cambio de 16.5 y 25.8% respectivamente en comparación con el grupo AK. Además de observarse, una diferencia significativa $****p < 0.0001$ y un porcentaje de cambio de 74.4, 69.3 y 65.4% en los grupos AK, AK-MO y AK-Clbx respectivamente, en comparación con el grupo SHAM (Fig. 18, C).

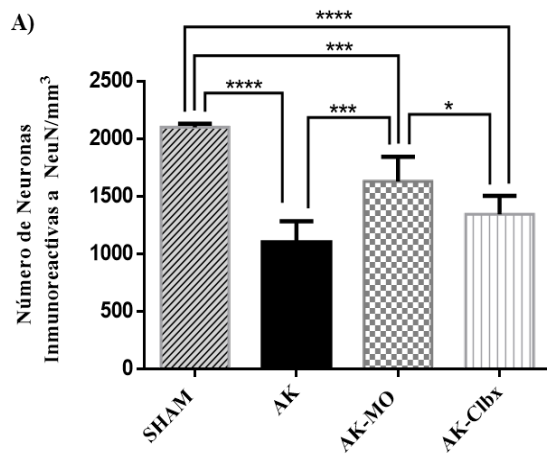
- **Hipocampo Ventral:**

En CA1 de hipocampo ventral los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron menor número de células inmunorreactivas a GFAP, con una diferencia significativa $**p < 0.001$ y $*p < 0.02$ con un porcentaje de cambio de 12.7 y 8.7% respectivamente, en comparación con el grupo AK. No obstante, mantienen una diferencia significativa $****p < 0.0001$ con un porcentaje de cambio de 57.5 y 59.4% respectivamente, en comparación con el grupo SHAM (Fig. 19, C).

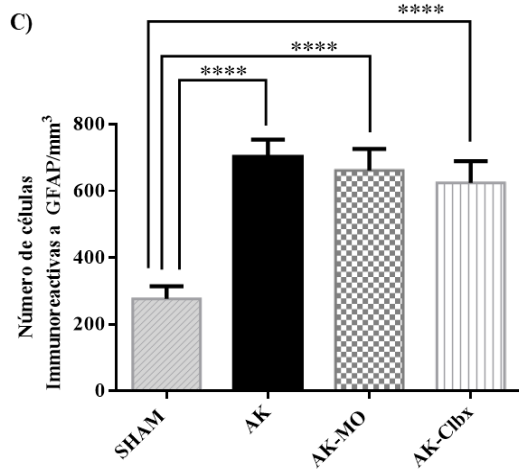
En el CA3, los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron menor expresión de células inmunorreactivas a GFAP con una diferencia significativa $****p < 0.0001$ y un porcentaje de cambio del 14.8 y 11.8% respectivamente, en comparación con el grupo AK. No obstante, los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron un mayor número de células gliales con una diferencia significativa $****p < 0.0001$ respectivamente, en comparación con el grupo SHAM, (Fig. 20, C).

En el GD, los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron una disminución en la expresión de células inmunorreactivas a GFAP, con una diferencia significativa $*p < 0.01$ y un porcentaje de cambio del 10.3 y .4% respectivamente, en comparación con el grupo AK. Sin embargo, en comparación con el grupo SHAM los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron mayor expresión de células gliales una diferencia significativa $****p < 0.0001$ y un porcentaje de cambio del 60.9 y 60.3% respectivamente, al igual que en el grupo AK, donde se observó una diferencia significativa $****p < 0.0001$ con un porcentaje de cambio del 64% (Fig. 21, C).

En el hilus, los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron un porcentaje de cambio del 3.3 y 6.4% respectivamente, en comparación con el grupo AK. Sin embargo, los AK-MO y AK-Clbx mostraron mayor expresión de células inmunorreactiva a GFAP counda diferencia significativa $****p < 0.0001$ y un porcentaje de cambio del 63.4 y 62.2% en comparación con el grupo SHAM (Fig. 22, C).



Capa celular CA1



Capa celular CA1

CA1- hipocampo dorsal

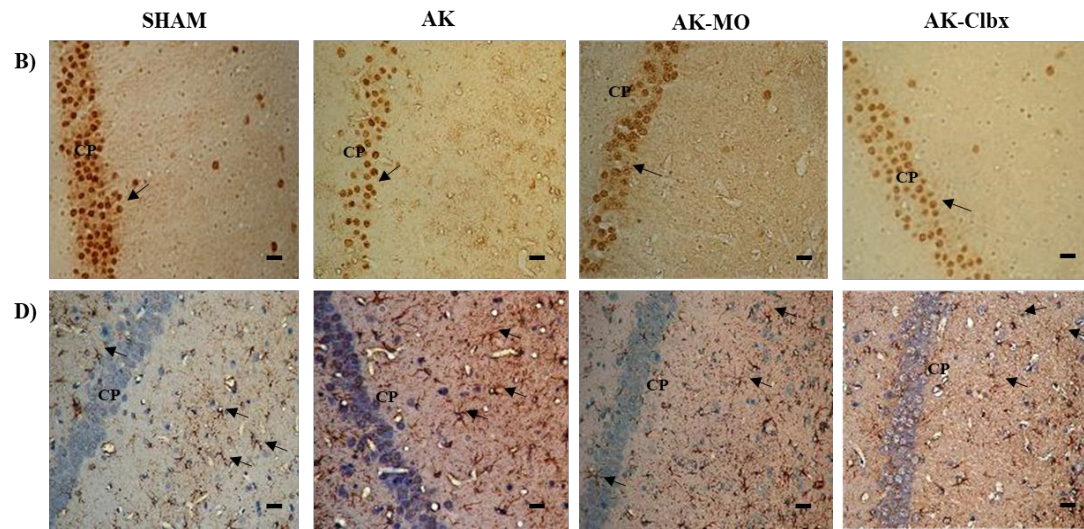


Fig. 15. CA1 de hipocampo dorsal al día 30 PN. A) Gráfica que muestra el promedio \pm desviación estándar (DE), del número de neuronas preservadas, inmunorreactivas a Neun N, donde el grupo AK-MO mostró mayor número de neuronas preservadas, con una diferencia significativa $***p < 0.0001$ y $*p < 0.01$ en comparación con los grupos AK y AK-Clbx. B) Fotomicrografías de hipocampo dorsal (40x) que muestran neuronas inmunorreactivas a NeunN en CA1 (CP-Capa piramidal). Donde el grupo AK-MO muestra mayor preservación neuronal en comparación con los grupos AK y AK-Clbx. Barra de calibración, 20 μ m. C) Gráfica que muestra el número de células inmunorreactivas a GFAP en el CA1, donde los grupos AK-MO y AK-Clbx no muestran diferencias significativas en comparación con el grupo AK. De igual forma, los tres grupos AK, AK-MO y AK-Clbx mostraron un incremento en el número de células gliales, con una diferencia significativa $****p < 0.0001$ en comparación con el grupo SHAM. D) Fotomicrografías de hipocampo dorsal (40x) que muestra células inmunorreactivas a GFAP (contrastada con hematoxilina) Barra de calibración, 25 μ m.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba de Tukey, $p < 0.05$.

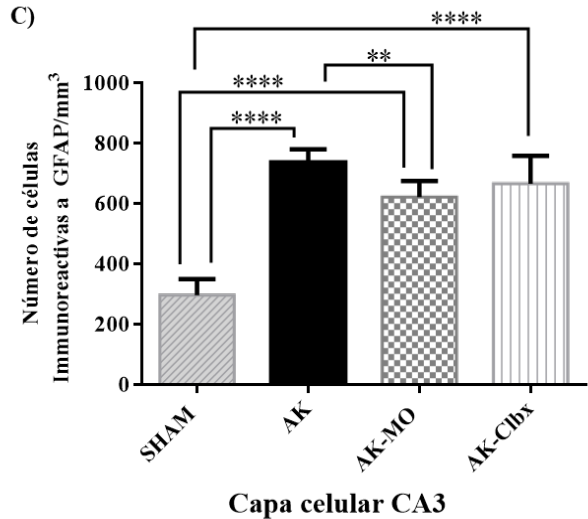
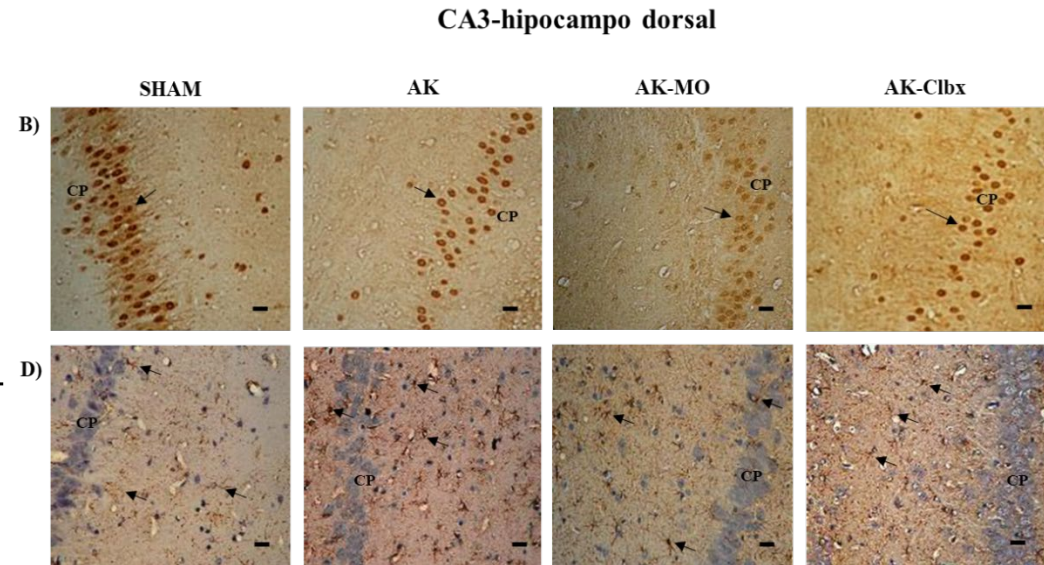
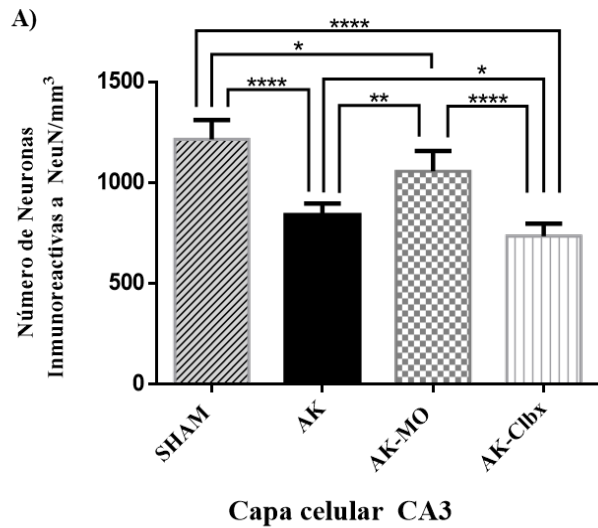
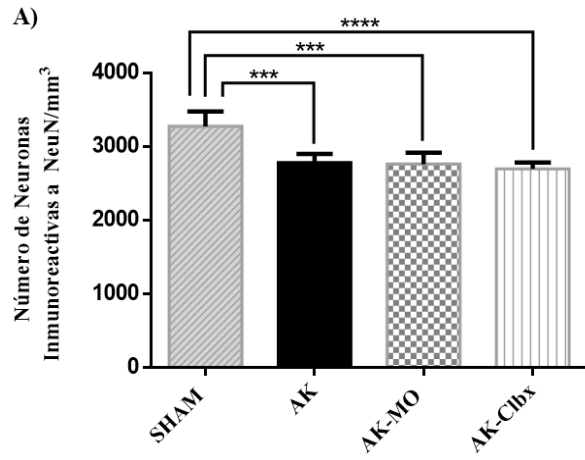
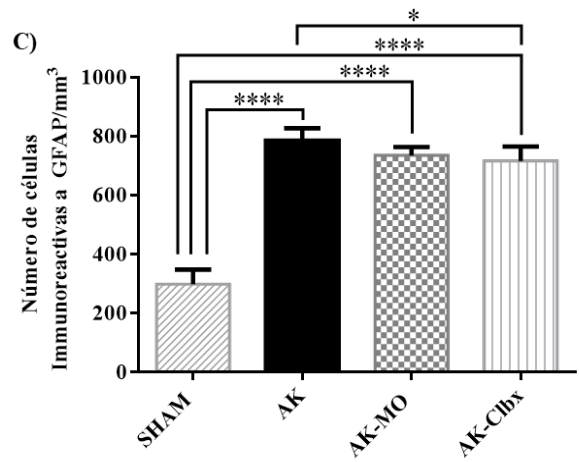


Fig. 16. CA3 de hipocampo dorsal al día 30 PN. A) Gráfica que muestra el promedio \pm desviación estándar (DE) del número de neuronas preservadas inmunoreactivas a Neun N, donde el grupo AK-MO mostró mayor número de neuronas preservadas, con una diferencia significativa $**p < 0.031$ y $****p < 0.0001$ en comparación con los grupos grupo AK y AK-Clbx. B) Fotomicrografías de hipocampo dorsal (40x) que muestran neuronas inmunoreactivas a NeunN en CA3 (CP-Capa piramidal). Donde el grupo AK-MO muestra mayor preservación neuronal en comparación con los grupos AK y AK-Clbx. Barra de calibración, 20 μ m. C) Gráfica que muestra el número de células gliales en CA3, donde el grupo AK-MO mostró menor número de células gliales, con una diferencia significativa $**p < 0.005$ en comparación con el grupo AK. No obstante, los grupos AK, AK-MO y AK-Clbx mostraron una diferencia significativa $****p < 0.0001$ en comparación con el grupo SHAM. D) Fotomicrografías de CA3 de hipocampo dorsal (40x) que muestran células inmunoreactivas a GFAP (contrastada con hematoxilina). Barra de calibración, 25 μ m.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba de Tukey, $p < 0.05$.



Capa de células granulares-GD



Capa de células granulares-GD

GD-hipocampo dorsal

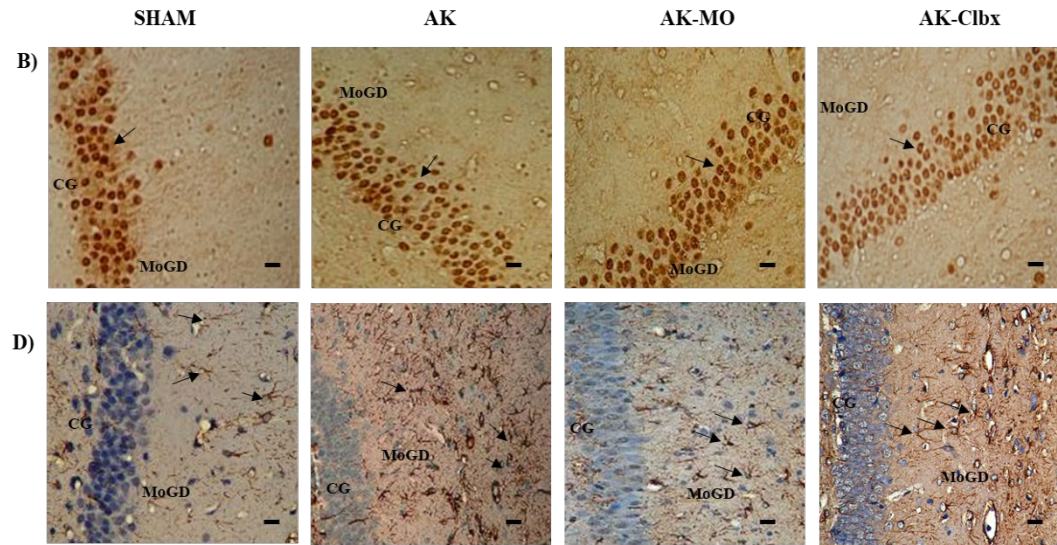


Fig. 17. Giro dentado (GD) de hipocampo dorsal al día 30 PN. A) Gráfica que muestra el promedio \pm desviación estándar (DE) del número de neuronas preservadas inmunorreactivas a Neun N, donde los grupos AK-Clbx y AK-MO no muestran diferencias significativas en comparación con el grupo AK, los tres grupos muestran menor número de neuronas preservadas, con una diferencia significativa $***p < 0.001$ en comparación con el grupo SHAM. B) Fotomicrografías de hipocampo dorsal (40x) que muestran neuronas inmunorreactivas a NeunN en la región GD (CG-capa granular). Barra de calibración, 20 μ m. C) Gráfica que muestra el número de células inmunorreactivas a GFAP en el GD, donde el grupo AK-Clbx mostró menor número de células gliales $**p < 0.043$, en comparación con el grupo AK. No obstante, los tres grupos AK, AK-MO y AK-Clbx mostraron un incremento del número de células gliales con una diferencia significativa $****p < 0.0001$, en comparación con el grupo SHAM. D) Fotomicrografías de GD de hipocampo dorsal (40x) que muestran células inmunorreactivas a GFAP (contrastada con hematoxilina). Barra de calibración, 25 μ m.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba de Tukey, $p < 0.05$.

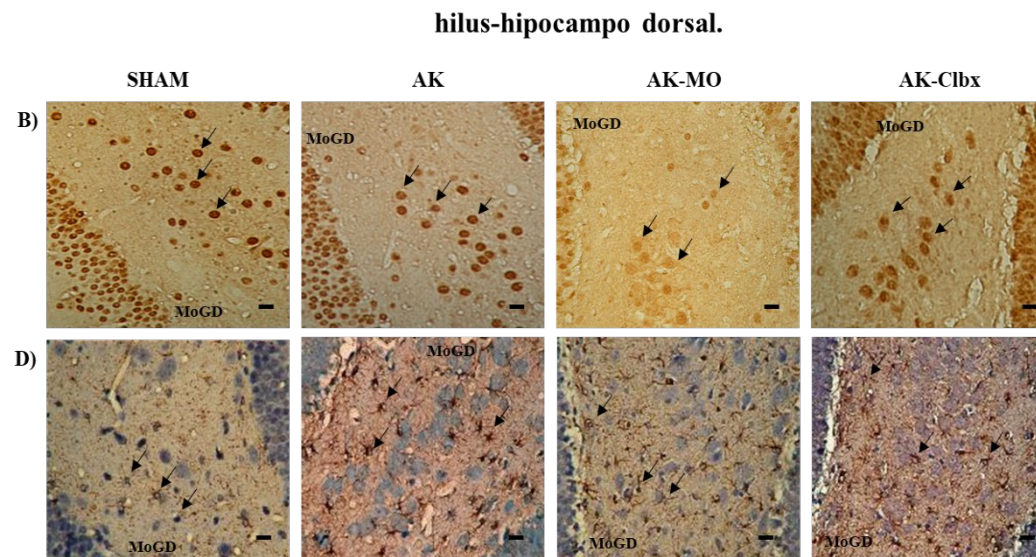
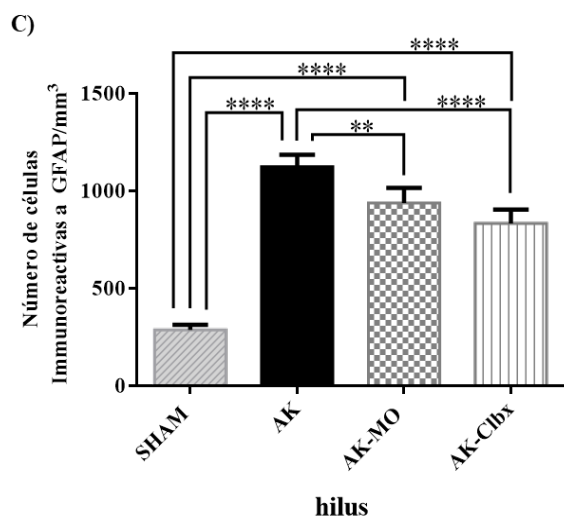
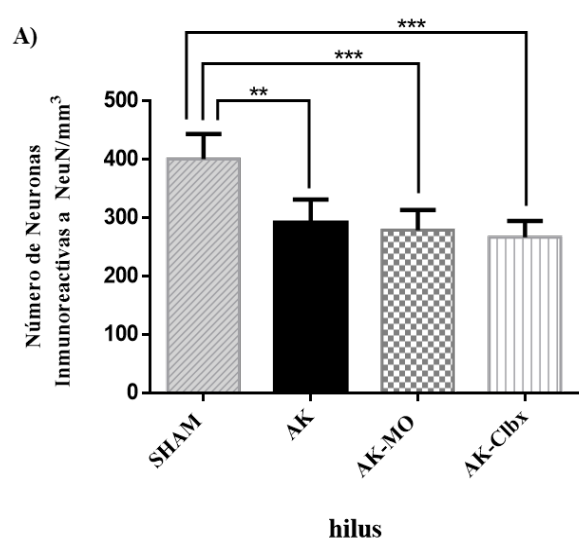


Fig. 18. Hilus del hipocampo dorsal al día 30 PN. A) Gráfica que muestra el promedio \pm desviación estándar (DE) del número de neuronas preservadas inmunorreactivas a Neun N, donde los grupos AK-MO y AK-Clbx no mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo AK, mostrando menor preservación neuronal con una diferencia significativa $***p < 0.001$, en comparación con el grupo SHAM. B) Fotomicrografías de hipocampo dorsal (40x) que muestran neuronas inmunorreactivas a Neun N en la región de hilus. Barra de calibración, 20 μ m. C) Gráfica que muestra el número de células inmunorreactivas a GFAP, donde los grupos AK-MO y AK-Clbx muestran menor número de células gliales, con una diferencia significativa $**p < 0.01$ y $****p < 0.0001$ respectivamente, en comparación con el grupo AK, no obstante, mantienen un incremento con una diferencia significativa $****p < 0.0001$, en comparación con el grupo SHAM. D) Fotomicrografías del hilus de hipocampo dorsal (40x) que muestran menor número de células en los grupos AK-MO y AK-Clbx (contrastada con hematoxilina). Barra de calibración, 25 μ m.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba de Tukey, $p < 0.05$.

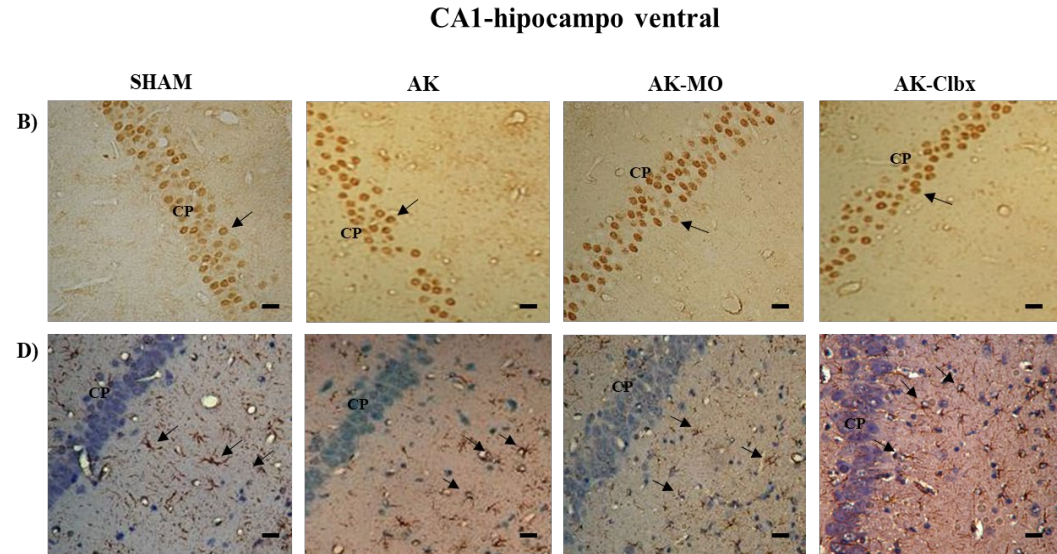
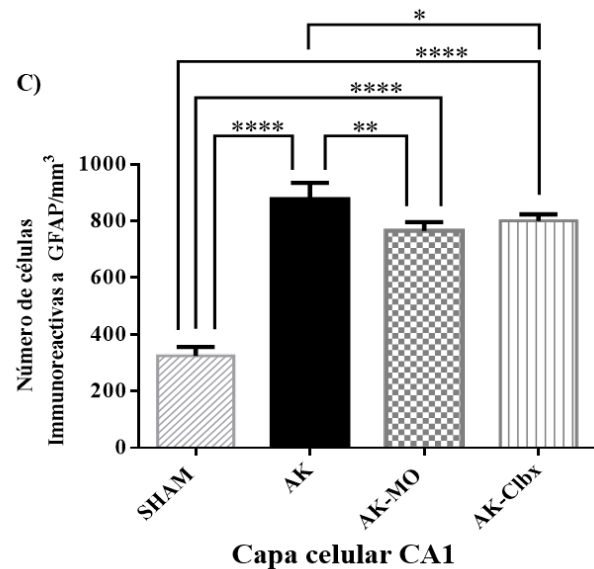
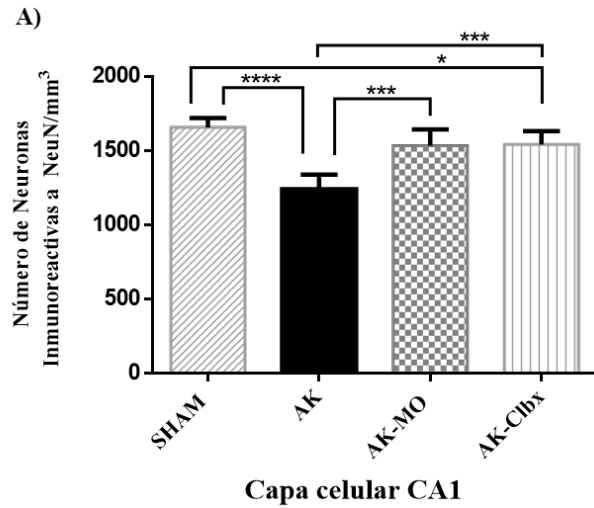


Fig. 19. CA1 de hipocampo ventral al día 30 PN. A) Gráfica que muestra el promedio \pm desviación estándar (DE) del número de neuronas preservadas inmunorreactivas a Neun N, donde los grupos AK-MO y AK-Clbx muestran mayor número de neuronas preservadas con una diferencia significativa $***p < 0.001$ en comparación con el grupo AK. El grupo AK-MO no muestra diferencias significativas con el grupo SHAM, únicamente el grupo AK-Clbx mostró menor preservación neuronal con una diferencia significativa $*p < 0.04$ en comparación con el grupo SHAM. B) Fotomicrografías de hipocampo ventral (40x) que muestran neuronas inmunorreactivas a Neun N en la región de CA1, donde se muestra mayor preservación neuronal en el grupo AK-MO. Barra de calibración, 20 μ m. C) Gráfica que muestra el número de células inmunorreactivas a GFAP, donde los grupos AK-MO y AK-Clbx muestran menor expresión de células gliales con una diferencia significativa $**p < 0.001$ y $*p < 0.02$ respectivamente, en comparación con el grupo AK, sin embargo, mantienen un incremento con una diferencia significativa $****p < 0.0001$ en comparación con el grupo SHAM. D) Fotomicrografías del CA1 de hipocampo ventral (40x), donde los grupos AK-MO y AK-Clbx muestran menor número de células inmunorreactivas a GFAP (contrastada con hematoxilina). Barra de calibración, 25 μ m.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba de Tukey, $p < 0.05$.

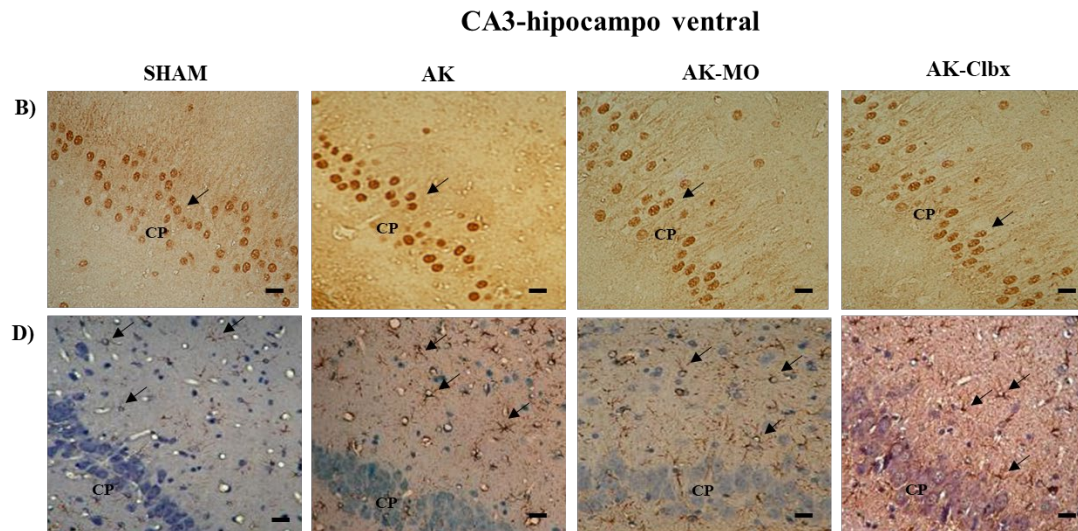
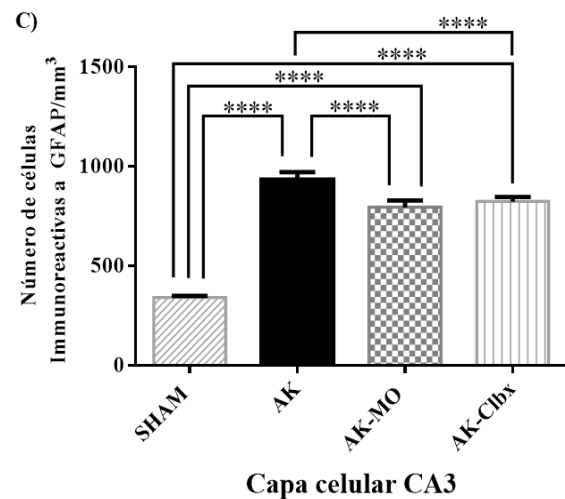
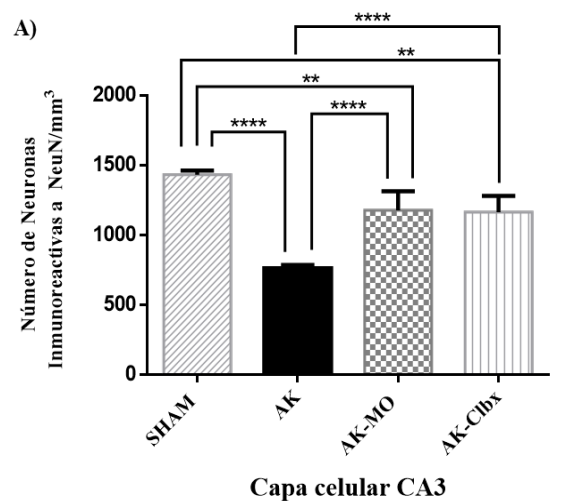


Fig. 20. CA3 de hipocampo ventral al día 30 PN. Gráfica que muestra el promedio \pm desviación estándar (DE) del número de neuronas preservadas inmunorreactivas a Neun N, donde los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron mayor número de neuronas preservadas con una diferencia significativa $****p < 0.0001$ en comparación con el grupo AK. B) Fotomicrografías de hipocampo ventral (40x) que muestran neuronas inmunorreactivas a Neun N en la región de CA3, donde se muestra mayor preservación neuronal en los grupos AK-MO y AK-Clbx. Barra de calibración, 20 μ m. C) Gráfica que muestra el número de células inmunorreactivas a GFAP, donde los grupos AK-MO y AK-Clbx muestran menor número de células gliales con una diferencia significativa $****p < 0.0001$ en comparación con el grupo AK. D) Fotomicrografías de CA3 de hipocampo ventral (40x) que muestra menor expresión de células inmunorreactivas a GFAP (contrastada con hematoxilina) en los grupos AK-MO y AK-Clbx en comparación con el grupo AK. Barra de calibración, 25 μ m.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba de Tukey, $p < 0.05$.

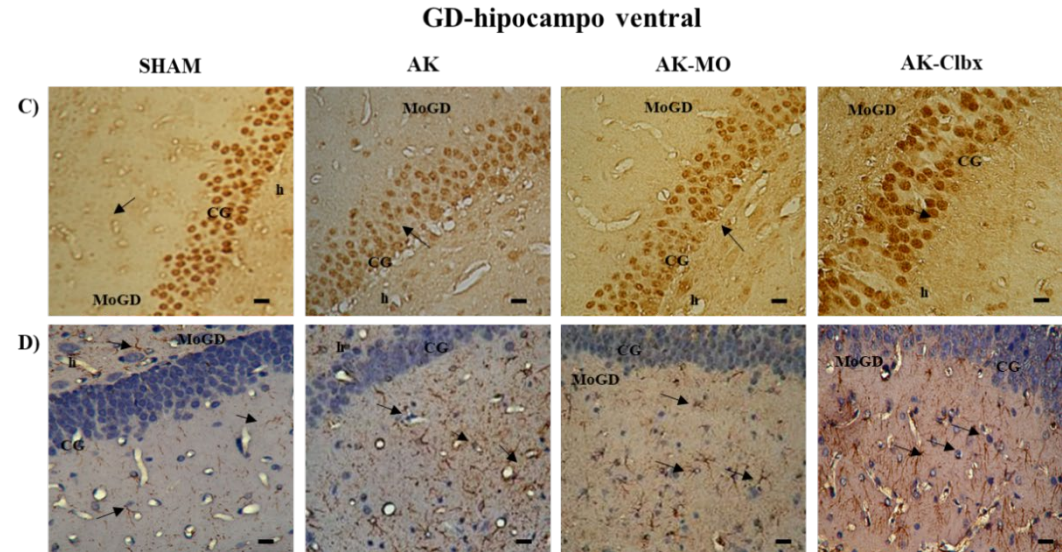
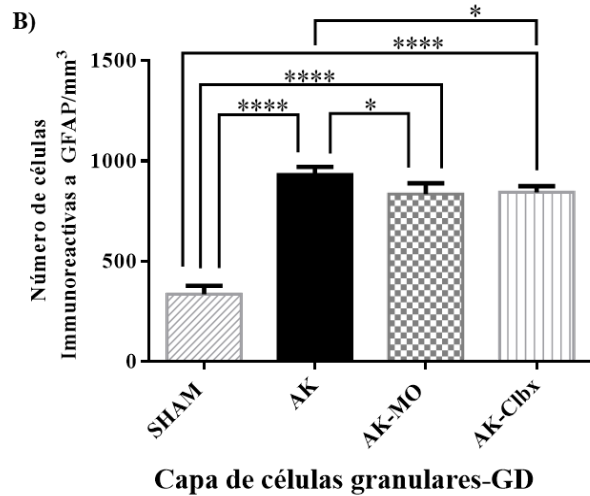
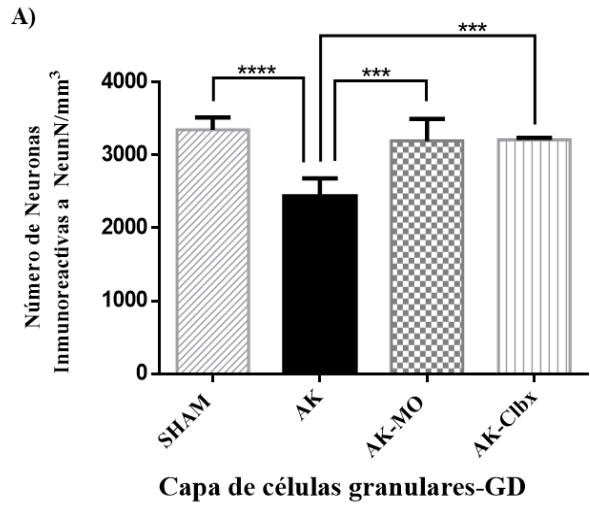


Fig. 21. Giro dentado (GD) de hipocampo ventral al día 30 PN. Gráfica que muestra el promedio \pm desviación estándar (DE) del número de neuronas preservadas inmunorreactivas a Neun N, donde los grupos AK-MO y AK-Clbx muestran mayor preservación neuronal con una diferencia significativa $***p < 0.0001$ en comparación con el grupo AK, los grupos AK-MO y AK-Clbx no muestran diferencias significativas con el grupo SHAM. B) Fotomicrografías de hipocampo ventral (40x) que muestran neuronas inmunorreactivas a NeunN en la región de GD, donde los grupos AK-MO y AK-Clbx muestran mayor preservación neuronal. Barra de calibración, 20 μ m. C) Gráfica que muestra el número de células inmunorreactivas a GFAP en el área GD, donde los grupos AK-MO y AK-Clbx muestran un incremento en la expresión de células gliales con una diferencia significativa $*p < 0.01$ en comparación con el grupo AK, no obstante, los grupos AK, AK-MO y AK-Clbx mostraron mayor número de células gliales con una diferencia significativa $****p < 0.0001$ en comparación con el grupo SHAM. D) Fotomicrografías del GD de hipocampo ventral (40x) que muestran menor número de células gliales (contrastada con hematoxilina) en los grupos AK-MO y AK-Clbx. Barra de calibración, 25 μ m.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba de Tukey, $p < 0.05$.

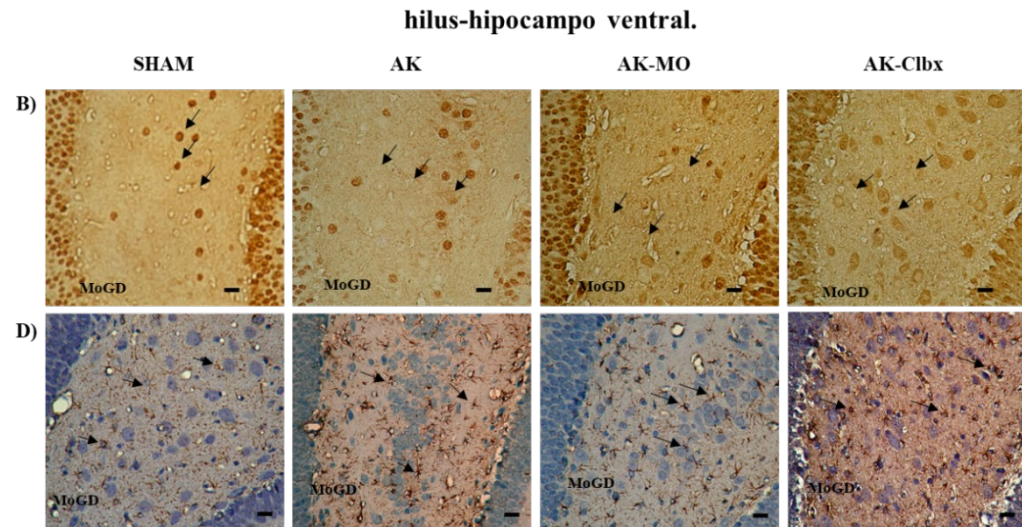
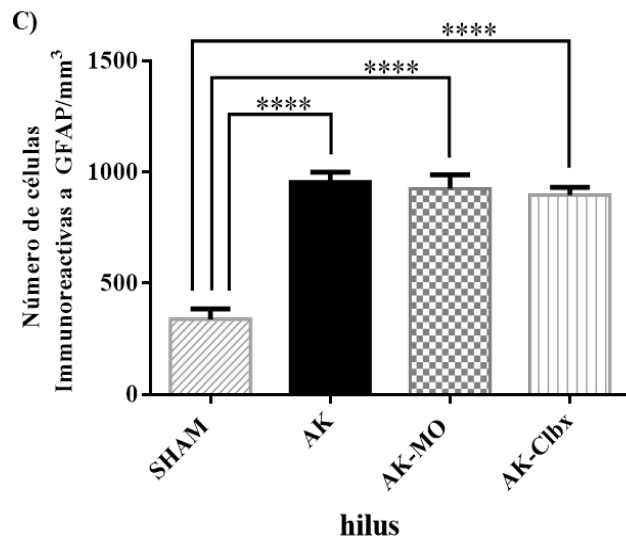
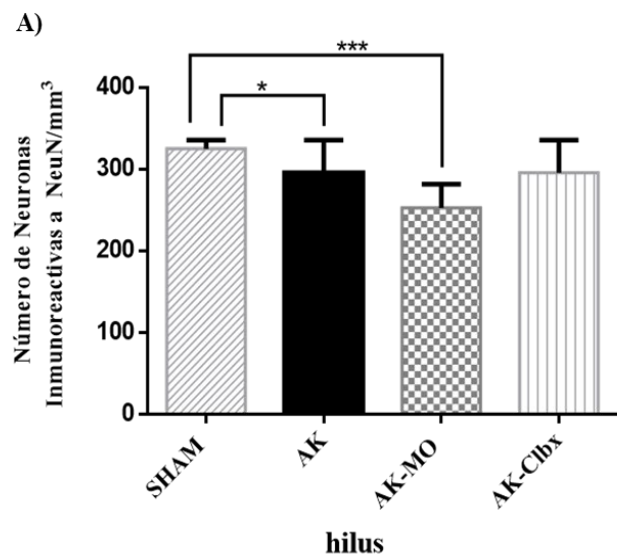


Fig. 22. Hilus del hipocampo ventral al día 30 PN. Gráfica que muestra el promedio \pm desviación estándar (DE) del número de neuronas preservadas inmunorreactivas a Neun N, donde los grupos los grupos AK-MO y AK-Clbx no muestran diferencias significativas en comparación con el grupo AK, de igual forma, los grupos AK, AK-MO muestran mayor una diferencia significativa $*p < 0.01$ y $***p < 0.0008$ en comparación con el grupo SHAM. B) Fotomicrografías de hipocampo ventral (40x) que muestran neuronas inmunorreactivas a Neun N en la región de hilus. Barra de calibración, 20 μ m. C) Gráfica que muestra el número de células inmunorreactivas a GFAP en el hilus, donde los grupos AK-MO y AK-Clbx no muestran diferencias significativas en comparación con el grupo AK y mantienen un incremento en la expresión de células gliales con una diferencia significativa $****p < 0.0001$ en comparación con el grupo SHAM. D) Fotomicrografías del hilus de hipocampo ventral (40x) que muestra células inmunorreactivas a GFAP (contrastada con hematoxilina). Barra de calibración, 25 μ m.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba de Tukey, $p < 0.05$.

3.- Evaluar el efecto neuroprotector de la MO sobre la susceptibilidad convulsiva al día 90PN (76 días post modelo *de Status epilepticus* recurrente).

A) Modelo de Status epilepticus recurrente:

B) Tratamientos control y experimental:

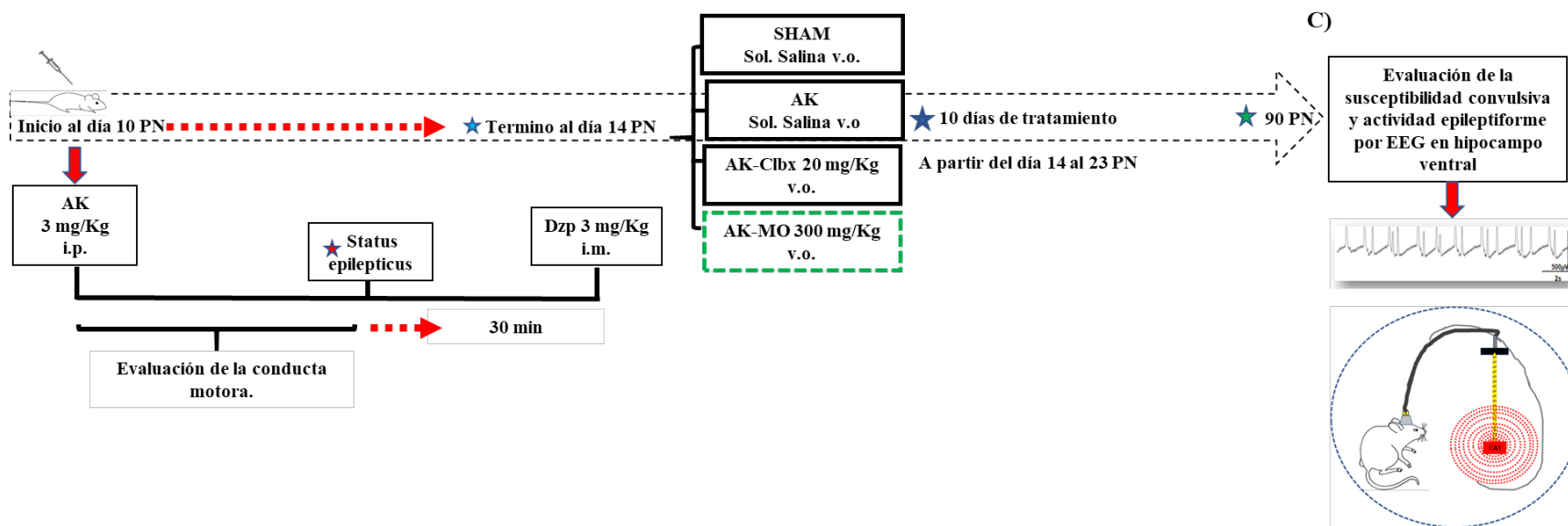


Fig. 23. Evaluación de la susceptibilidad convulsiva y actividad epileptiforme al día 90 PN: A) Modelo de *Status epilepticus* recurrente inducido con ácido kaínico (AK) i.p. y contenido 30 min después con Dzp (Diazepam) i.m. B) Tratamientos control y experimental: SHAM-solución (Sol.) salina v.o., AK (ácido kaínico)- sol. salina v.o., AK-MO (*Magnolia officinales*), AK-Clbx (Celecoxib) durante 10 días (a partir del día 14 al 23 PN). C) Evaluación de la susceptibilidad convulsiva y actividad epileptiforme por medio de la determinación del umbral post descarga (UPD) y electroencefalograma (EEG) en CA1 de hipocampo ventral, al día 90 PN (76 días post *Status epilepticus* recurrente).

3.1.-Evaluar la hiperexcitabilidad neuronal por medio de la determinación del umbral post descarga en el hipocampo ventral día 90 PN, en los grupos con y sin tratamiento subcrónico con MO.

Los valores de UPD en los grupos AK, AK-MO y AK-Clbx mostraron una disminución significativa $***p < 0.0025$, $****p < 0.0001$ y $****p < 0.0049$ respectivamente, en comparación con el grupo SHAM, observando un porcentaje de cambio del 56% entre los grupos SHAM y AK, del 74.7% entre los grupos SHAM y AK-MO y del 49.59% entre los grupos SHAM y AK-Clbx. Por otro lado, los valores del UPD del grupo AK, en comparación con los valores de los grupos AK-Clbx y AK-MO, no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, se observa un porcentaje de cambios del 42.4% entre los grupos AK y AK-MO y del 49.9% entre los grupos AK-Clbx y AK.

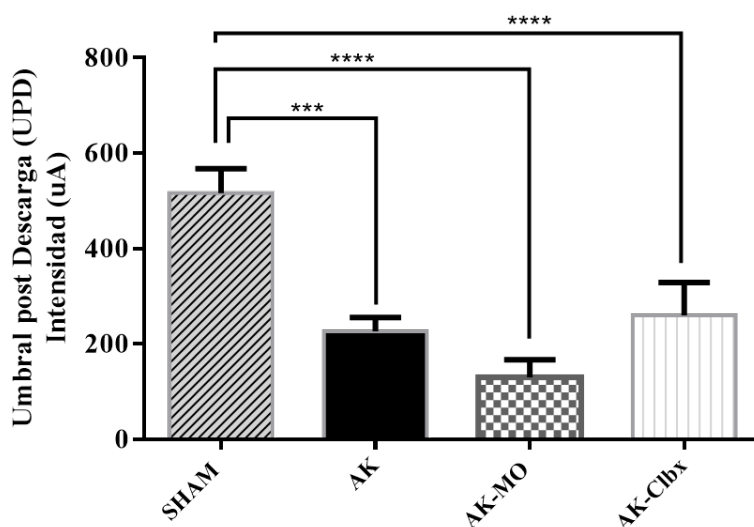


Fig. 24. Determinación del umbral post descarga. promedio \pm error estándar (EE) de los valores del umbral post descarga (UPD) de los grupos AK, AK-MO y AK-Clbx que mostraron una disminución significativa $***p < 0.003$ y $****p < 0.0001$ respectivamente, en comparación con el grupo control SHAM.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba de Bonferroni's, $p < 0.05$.

La conducta motora observada durante la evaluación del UPD, mostró que el 100% de las ratas pertenecientes a los grupos SHAM, AK-MO y AK-CIbx, presentaron una Fase I en la escala de Racine, correspondiente a guiño ipsilateral y sacudidas de perro mojado. Mientras que, el 70% de los animales del grupo AK presentaron actividad convulsiva de tipo tónico clónica correspondiente a una Fase V y el 30% restante, una fase III en la escala de Racine (Racine 1972).

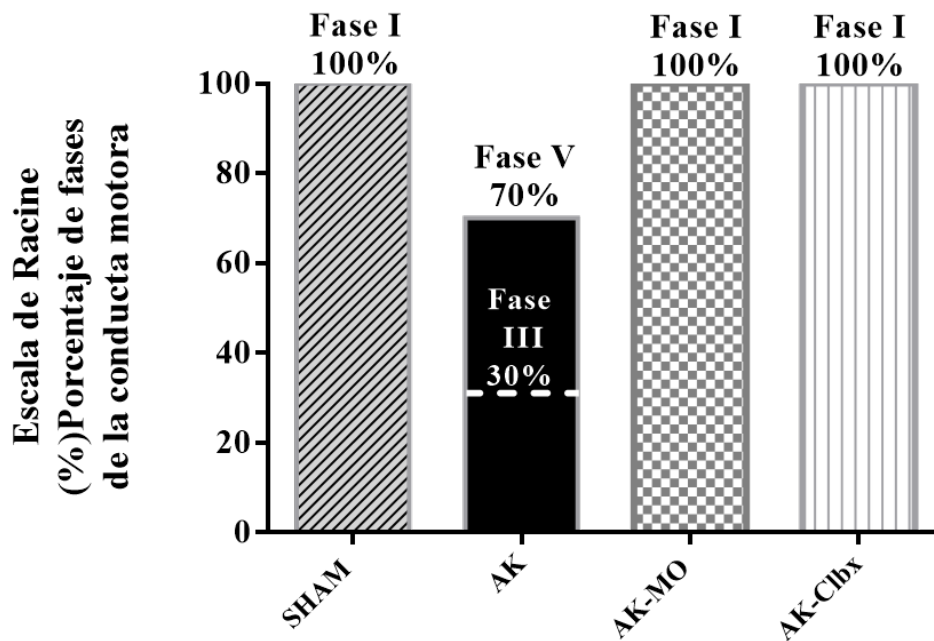


Fig. 25. Evaluación de la conducta motora por medio de la escala de Racine. Porcentaje de ratas por grupo control y experimental que presentaron cambios en la conducta motora durante la evaluación del umbral post descarga (UPD), mediante la escala modificada de Racine. Fase I.- Guiño ipsilateral y sacudidas de perro mojado. Fase II.-Masticaciones, movimientos faciales y de Cabeza. Fase III.- Clónus de miembros anteriores. Fase IV.- Posición de canguro. Fase V.- Pérdida de la postura y clónus de miembros (*escala de Racine modificada, tomado de Racine, 1972*).

3.2.-Evaluar la actividad epileptiforme por medio de EEG en el hipocampo ventral al día 90 PN, en los grupos con y sin tratamiento subcrónico con *Magnolia officinalis*.

- **Periodo basal.**

El grupo SHAM mostro actividad homogénea en todas las bandas analizadas, con un incremento en la actividad de 0.1–4 Hz delta, 4–8 Hz teta, 13–30 Hz beta y 30–90 Hz gamma, mostrando una diferencia significativa $\alpha p < 0.0001$ respectivamente, en comparación con los grupos AK, AK-MO y AK-Clbx bajo condiciones basales.

Por el contrario, el grupo AK mostró menor actividad en las bandas 0.1–4 Hz delta, 4–8 Hz teta y 13–30 Hz beta con una diferencia significativa $\beta p < 0.0001$ y un incremento de las bandas 8–13 Hz alfa y 30–90 Hz gamma con una diferencia significativa $\beta p < 0.0001$ respectivamente, en comparación con el grupo SHAM.

De igual forma, los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron menor actividad en las bandas 0.1–4 Hz delta, 4–8 Hz teta y 8–13 Hz alfa con una diferencia significativa $\beta p < 0.0001$ respectivamente y un incremento en la actividad de la banda 13–30 Hz beta con una diferencia significativa $\beta p < 0.0001$, de forma similar al grupo AK (Fig. 26). En el análisis espectral del periodo basal se observó la prevalencia de actividad de baja frecuencia en los grupos SHAM, AK, AK-MO y AK-Clbx (Fig. 27).

- **Periodo post UPD.**

En los resultados obtenidos del análisis por frecuencias por medio de EEG durante el periodo post UPD, el grupo SHAM mostró mayor actividad similar al periodo basal en las bandas 4-8 Hz delta, 13-30 Hz alfa y 30-90 Hz gamma, una diferencia significativa $\alpha p < 0.0001$ respectivamente, en comparación con los grupos AK, AK-MO y AK-Clbx.

El grupo AK, mostró la prevalencia de actividad de las bandas 0-4 Hz delta, 4-8 Hz teta y de 8-13 Hz alfa y una disminución de oscilaciones de alta frecuencia, 30-90 Hz gamma, mostrando una diferencia significativa $\beta p < 0.0001$ en comparación con el grupo SHAM. Por otra parte, los grupos AK-MO y AK-Clbx mantuvieron actividad de las bandas 0.1-4 Hz delta, 4-8 Hz teta y 8-13 Hz alfa, similar al periodo basal. No obstante, ambos grupos mostraron un incremento en la actividad de 13-30 Hz beta y una disminución en la de 30-90 Hz gamma, similar al grupo AK con una diferencia significativa $\beta p < 0.0001$ respectivamente, en comparación con los grupos SHAM y AK (Fig.28).

En el análisis espectral se observó la prevalencia de actividad de baja frecuencia similar al periodo basal en los grupos SHAM, AK-MO y AK-Clbx, en comparación con el grupo AK. El grupo AK mostró un aumento de energía máxima (aumento de colores rojos) correspondiente a actividad epileptiforme, no así, en los grupos AK-MO y AK-Clbx (Fig. 29).

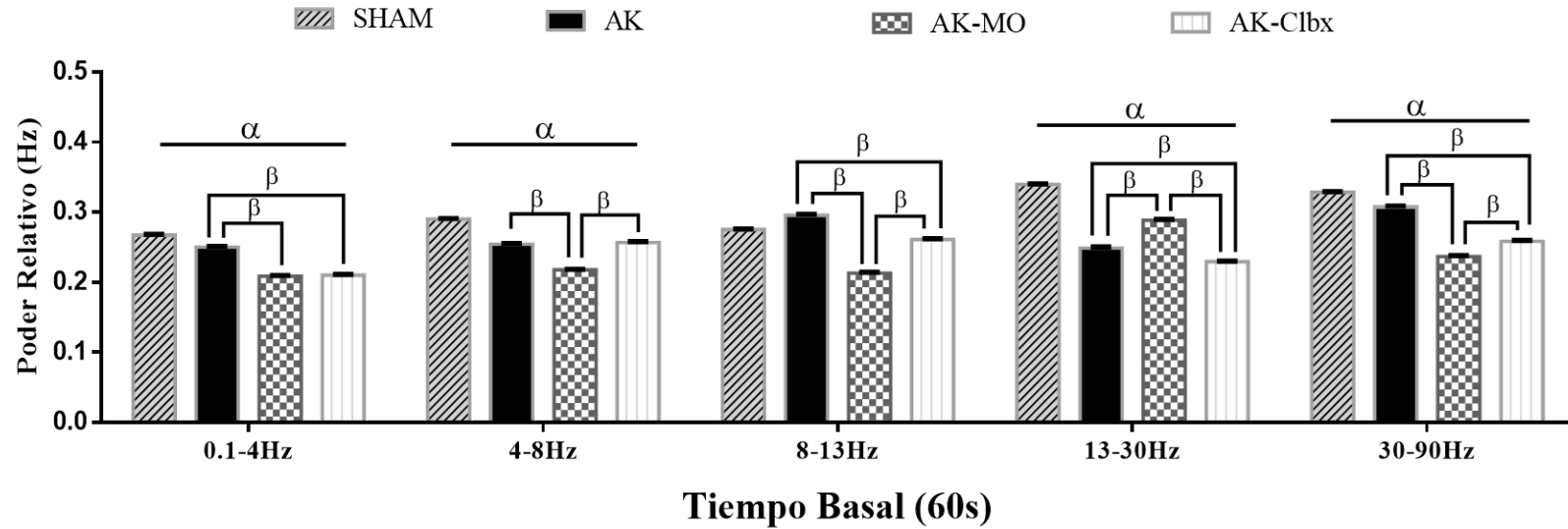


Fig. 26. Espectros de poder relativo de diferentes frecuencias obtenidas de registros en condiciones basales. El grupo SHAM mostró actividad homogénea en todas las bandas analizadas, mostrando una diferencia significativa $\alpha p < 0.0001$ respectivamente, en comparación con los grupos AK, AK-MO y AK-CIbx bajo condiciones basales. Los grupos AK, AK-MO y AK-CIbx muestran un predominio de actividad de baja frecuencia con menor actividad en las bandas 0.1–4 Hz delta, 4–8 Hz teta y 13–30 Hz beta con una diferencia significativa $\beta p < 0.0001$ en comparación con el grupo SHAM y un incremento de las bandas 13-30 Hz con una diferencia significativa $\beta p < 0.0001$ respectivamente, en comparación con el grupo AK. El grupo AK muestra mayor actividad de la banda 30-90 Hz gamma con una diferencia significativa $\beta p < 0.0001$ en comparación con los grupos AK-MO y AK-CIbx.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba de Bonferroni's, $p < 0.05$.

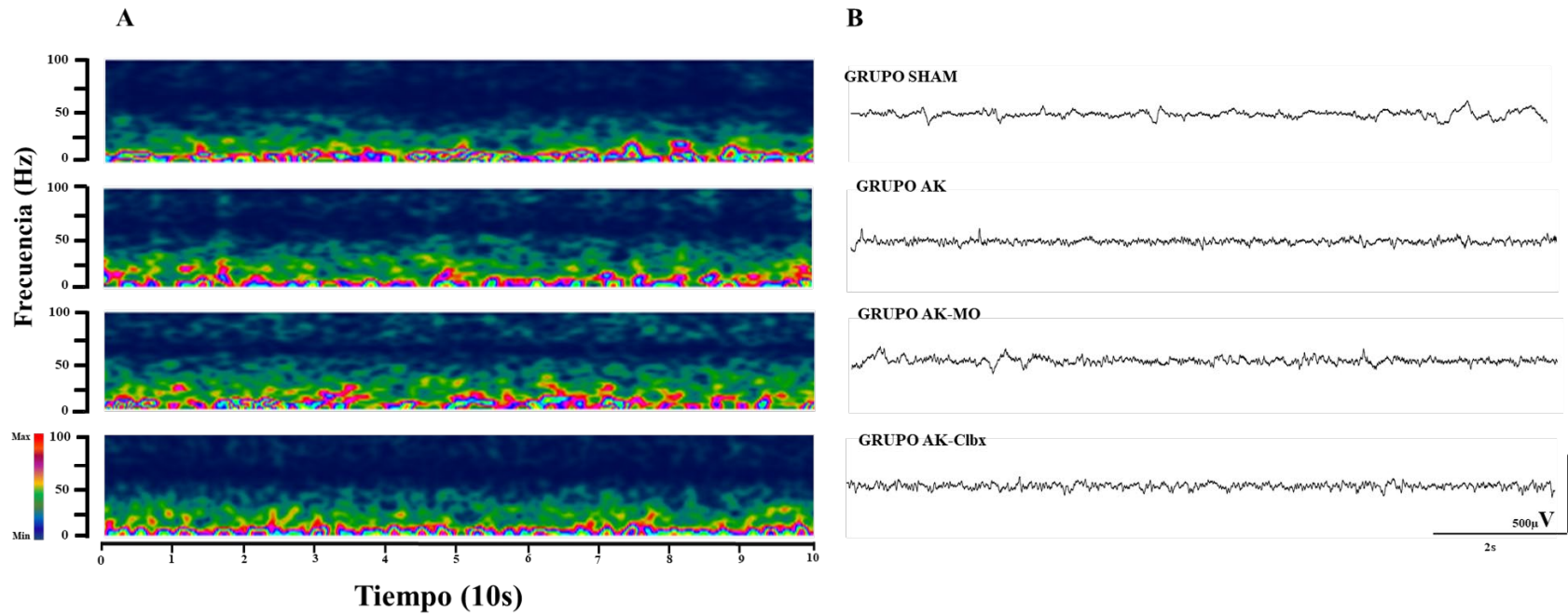


Fig. 27. Análisis espectral y EEG del periodo basal: A) Espectrogramas (0.1-100Hz) y B) actividad electrográfica del hipocampo, obtenida bajo condiciones basales en los diferentes grupos SHAM, AK, AK-MO y AK-CIbx. **Barra de color:** los colores rojos indican una energía máxima y los colores azules indican una energía mínima.

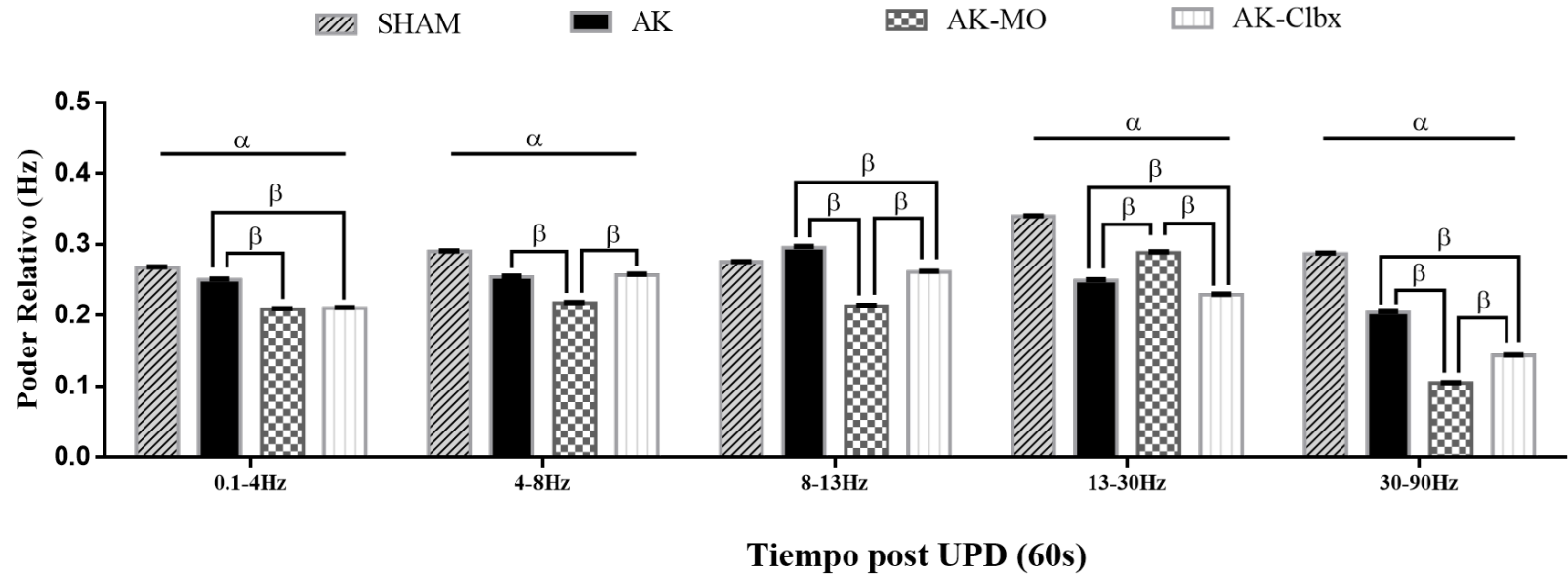


Fig. 28. Espectros de poder relativo de diferentes frecuencias obtenidas posterior a la determinación del UPD. El grupo SHAM muestra mayor actividad similar al periodo basal en las bandas 4-8 Hz delta, 13-30 Hz alfa y 30-90 Hz gamma, una diferencia significativa $\alpha p < 0.0001$ respectivamente, en comparación con los grupos AK, AK-MO y AK-CIbx. En el grupo AK, se observa la prevalencia de actividad de las bandas 0-4 Hz delta, 4-8 Hz teta y de 8-13 Hz alfa y una disminución de oscilaciones de alta frecuencia, 30-90 Hz gamma, con una diferencia significativa $\beta p < 0.0001$ en comparación con el grupo SHAM. Los grupos AK-MO y AK-CIbx mantuvieron actividad de las bandas 0.1-4 Hz delta, 4-8 Hz teta y 8-13 Hz alfa, similar al periodo basal y una disminución de la banda de 30-90 Hz gamma con una diferencia significativa $\beta p < 0.0001$ con comparación con los grupos SHAM y AK.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba de Bonferroni's, $p < 0.05$.

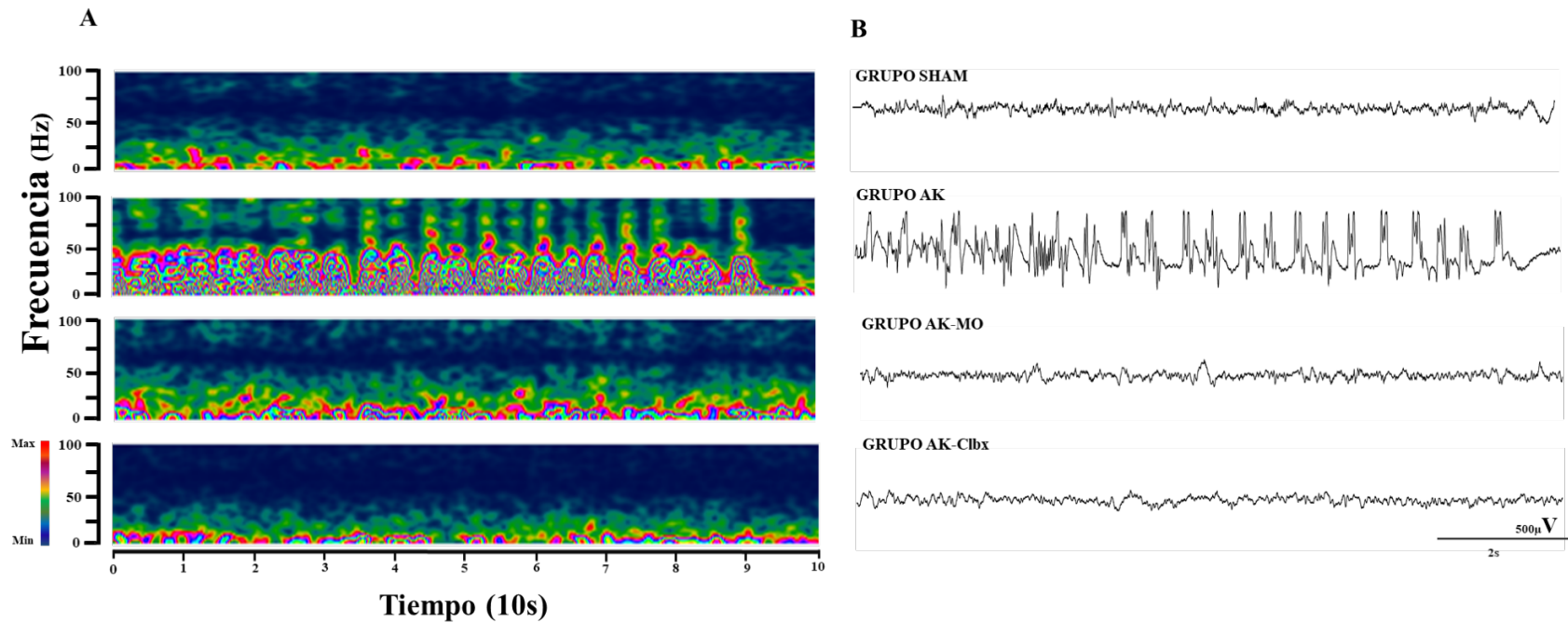


Fig. 29. Análisis espectral y EEG del periodo post UPD: A) Espectrogramas (0.1-100 Hz) y B) actividad electrográfica de hipocampo obtenida posterior a la determinación del umbral post descarga (UPD). Donde se observa actividad sincrónica de alta frecuencia en el grupo AK y actividad de baja frecuencia en los grupos SHAM, AK-MO y AK-C1bx, posterior a la determinación del UPD. **Barra de color: los colores rojos indican una energía máxima y los colores azules indican una energía mínima.**

4.- Evaluar el efecto neuroprotector de la MO al día 90 PN (76 días post modelo de Status epilepticus recurrente inducido por AK) en el hipocampo.

A) Modelo de Status epilepticus recurrente:

B) Tratamientos control y experimental:

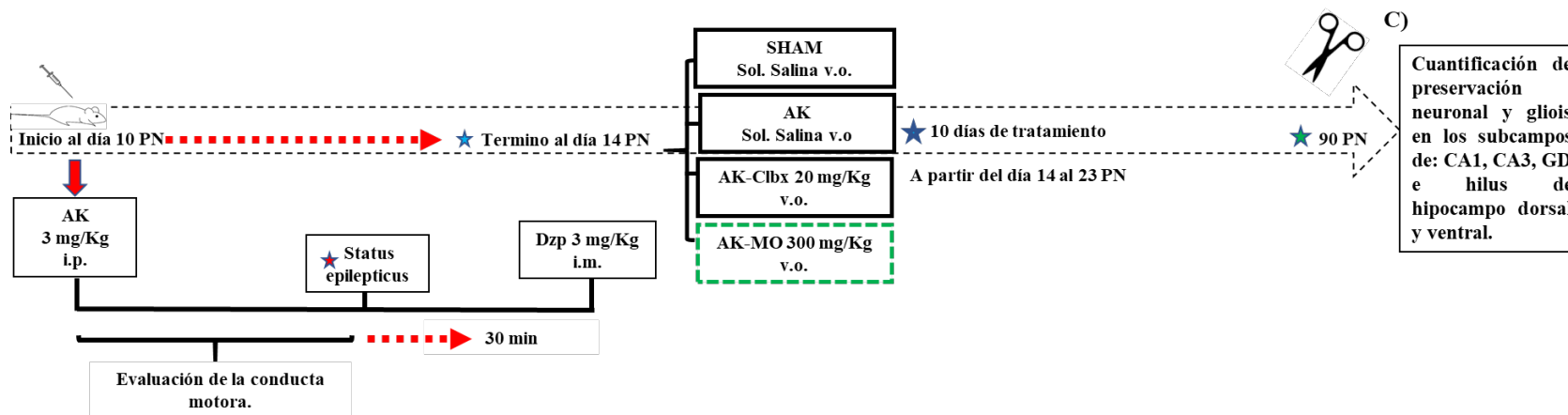


Fig. 30. Cuantificación de la preservación neuronal y evaluación cualitativa de gliosis en hipocampo al día 90 PN. A) Modelo de *Status epilepticus* recurrente inducido con ácido kaínico (AK) i.p. y contenido 30 min después con Dzp (Diazepam) i.m. B) Tratamientos control y experimental: SHAM-solución (Sol.) salina v.o., AK (ácido kaínico)- sol. salina v.o., AK-MO (*Magnolia officinales*), AK-Clbx (Celecoxib) durante 10 días (a partir del día 14 al 23 PN). C) corte de tiempo al día 90 PN para cuantificar la preservación neuronal y la presencia de gliosis por inmunohistoquímica con marcaje con Neun N y GFAP en las áreas CA1, CA3, GD e hilus del hipocampo dorsal y ventral.

4.1.- Cuantificar el número de neuronas preservadas en las regiones de CA1, CA3, GD e hilus de hipocampo dorsal y ventral, empleando la técnica de inmunohistoquímica por marcaje con Neun N, en los grupos con y sin tratamiento subcrónico con *Magnolia officinalis*.

- **Hipocampo dorsal:**

En la región CA1, los grupos experimentales AK-MO y AK-Clbx muestran un mayor número de neuronas preservadas con una diferencia significativa **** $p < 0.0001$ y un porcentaje de cambio de 31.84 y 46.20% respectivamente, en comparación con el grupo AK. De igual forma, el grupo AK mostró una disminución significativa **** $p < 0.0001$ en el número de neuronas en la región de CA1 de hipocampo dorsal con un porcentaje de cambio del 57.5% en comparación con el grupo SHAM. Los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron un menor número de neuronas preservadas con una diferencia significativa **** $p < 0.0001$ y ** $p < 0.003$ respectivamente, en comparación con el grupo SHAM (Fig. 31 A, B).

En la región de CA3, los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron una diferencia significativa **** $p < 0.0001$ en comparación con el grupo AK. No se observaron diferencias entre los grupos AK-MO y AK-Clbx. Sin embargo, los grupos AK, AK-MO y AK-Clbx mostraron una diferencia significativa **** $p < 0.0001$ en comparación con el grupo SHAM, con un porcentaje de cambio de 65.9%, 42.35% y 45.5% respectivamente (Fig. 32 A, B).

En el GD, los grupos AK y AK-MO mostraron menor preservación neuronal, con una diferencia significativa **** $p < 0.0001$ y un porcentaje de cambio de 34% y 19.36%, respectivamente en comparación con el grupo SHAM. Por otra parte, el grupo AK-Clbx mostró un porcentaje de cambio mínimo de 7.3% en comparación con el grupo SHAM y un mayor número de neuronas

preservadas en comparación con los grupos AK y AK-MO con una diferencia significativa $***p < 0.001$ y $*p < 0.03$ y un porcentaje de cambio de 29.2 y 12.9%, respectivamente (Fig. 33 A, B).

En el hilus los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron mayor número de neuronas preservadas, con una diferencia significativa $****p < 0.0001$ en comparación con el grupo AK y una $*p < 0.03$ en comparación con el grupo SHAM. Se observó, un porcentaje de cambio de 15 y 14.3% en los grupos AK-MO y AK-Clbx respectivamente, en comparación con el grupo SHAM y de 30.9 y 31.4% en los grupos AK-MO y AK-Clbx respectivamente, en comparación con el grupo AK (Fig. 34 A, B).

- **Hipocampo ventral:**

En la región CA1, el grupo AK-MO no mostró diferencias significativas en el número de neuronas preservadas con respecto a los demás grupos, sin embargo, mostró un porcentaje de cambio del 37.46% en comparación con el grupo AK y del 19.8% con respecto al grupo SHAM. De la misma forma, los grupos AK y AK-Clbx, mostraron un menor número de neuronas preservadas, con una diferencia significativa en $**p < 0.001$ y $*p < 0.01$ y un porcentaje de cambio de 41.6 % y 18% respectivamente en comparación con el grupo SHAM. Por otra parte, el grupo AK-Clbx mostró mayor preservación neuronal con una diferencia significativa de $*p < 0.01$ y un porcentaje de cambio del 28.8% en comparación con el grupo AK-Clbx (Fig. 35 A, B).

En la región CA3, no se observaron diferencias significativas en los grupos AK-MO y AK-Clbx en comparación con los grupos SHAM y AK, no obstante, mantienen un porcentaje de cambio de 15% y 20.3% respectivamente, en comparación con el grupo AK. Por otra parte, el grupo AK mostró mayor pérdida neuronal, con una diferencia significativa $*p < 0.01$ y un porcentaje de cambio del 20%, en comparación con el grupo SHAM (Fig. 36 A, B).

En la capa granular del GD, los grupos AK-Clbx y AK-MO mostraron mayor preservación neuronal, con una diferencia significativa $***p < 0.001$ y $*p < 0.01$ y un porcentaje de cambio de 31.45% y 24.7% respectivamente en comparación con el grupo AK. En el grupo AK se observó menor preservación neuronal, con significativa $***p < 0.001$ en comparación con el grupo SHAM (Fig. 37 A, B).

Por otra parte, en el hilus los grupos AK-MO y AK-Clbx mostraron mayor preservación neuronal, con una diferencia significativa $***p < 0.001$ y $****p < 0.0001$ y un porcentaje de cambio de 30.9 y 31.4% en comparación con el grupo AK. Así mismo el grupo AK mostró mayor pérdida neuronal con una diferencia significativa $****p < 0.0001$ en comparación con el grupo SHAM. Los grupos AK-MO y AK-Clbx no mostraron diferencias significativas con el grupo SHAM (Fig. 38 A, B).

4.2 Evaluar cualitativamente la presencia de gliosis las regiones de CA1, CA3, GD e hilus de hipocampo dorsal y ventral, empleando la técnica de inmunohistoquímica por marcaje con GFAP, en los grupos con y sin tratamiento subcrónico con *Magnolia officinalis*.

En el hipocampo dorsal y ventral el grupo AK mostró gran expresión de células inmunorreactivas a GFAP en las regiones de CA1 (Fig. 31 C; Fig. 35 C), CA3 (Fig. 32 C; Fig. 36 C), GD (Fig. 33 C; Fig. 37 C) e hilus (Fig. 34 C; Fig. 38 C), con cambios en el tamaño y forma del núcleo y un aumento en las extensiones de astrocitos lo que indicó gliosis reactiva. Por otra parte, los grupos AK-MO y AK-CIbx mostraron menor expresión de células inmunorreactivas a GFAP en las regiones de CA1 y CA3, pero no así en el GD e hilus donde se observa mayor expresión de gliosis.

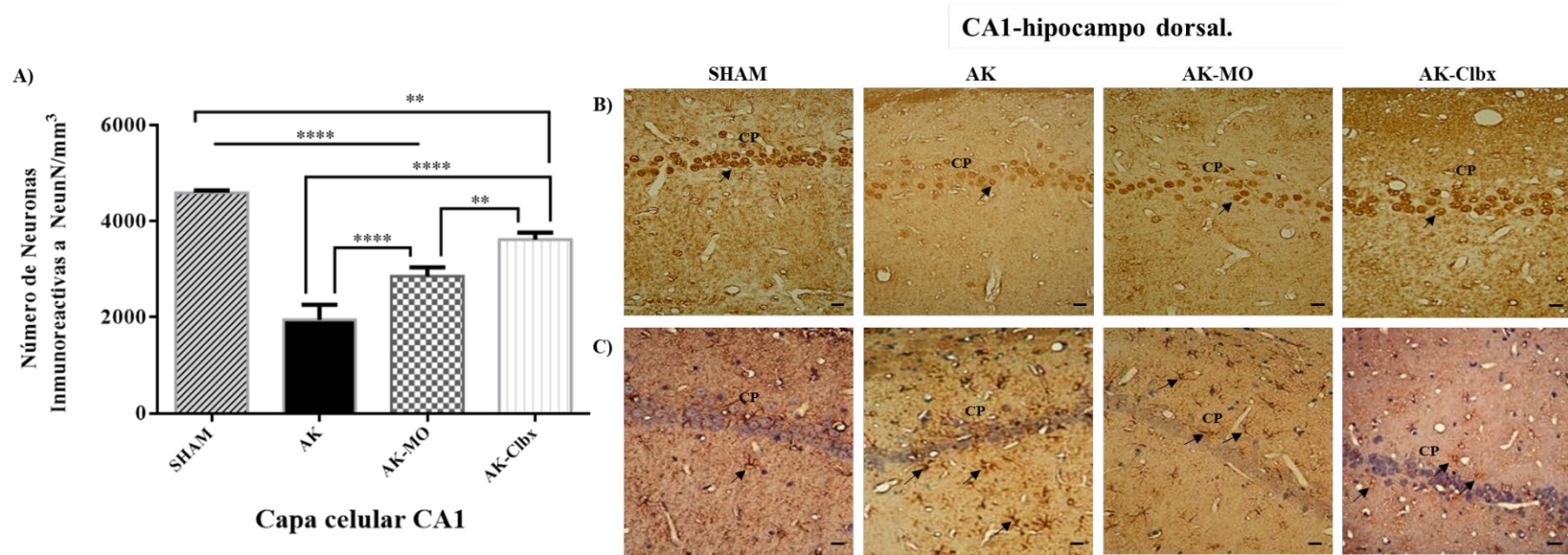


Fig. 31. CA1 de hipocampo dorsal al día 90 PN: A) Gráfica que muestra el promedio \pm error estándar (EE) del número de neuronas inmunorreactivas a Neun N, donde los grupos AK-MO y AK-Clbx muestran mayor preservación neuronal con una diferencia significativa $****p < 0.0001$ en comparación con el grupo AK. No obstante, el grupo AK-MO muestra menor preservación neuronal una diferencia significativa $**p < 0.003$ y $****p < 0.0001$ en comparación con los grupos AK-Clbx y SHAM respectivamente. **B)** Fotomicrografías de hipocampo dorsal (40x) que muestran neuronas inmunorreactivas a Neun N en la región de CA1 en los diferentes grupos, donde se observa mayor preservación neuronal en los grupos AK-MO y AK-Clbx en comparación con el grupo AK. (CP-Capa Piramidal). Barra de calibración, 20 μ m. **C)** Fotomicrografías de hipocampo dorsal (40x) que muestra células inmunorreactivas a GFAP (contrastada con hematoxilina) en los diferentes grupos control y experimental, donde se observa la presencia de gliosis reactiva en la región de CA1, siendo mayor en el grupo AK en comparación con los grupos SHAM, AK-MO y AK-Clbx. (CP-Capa piramidal). Barra de calibración, 25 μ m.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba de Bonferroni's, $p < 0.05$.

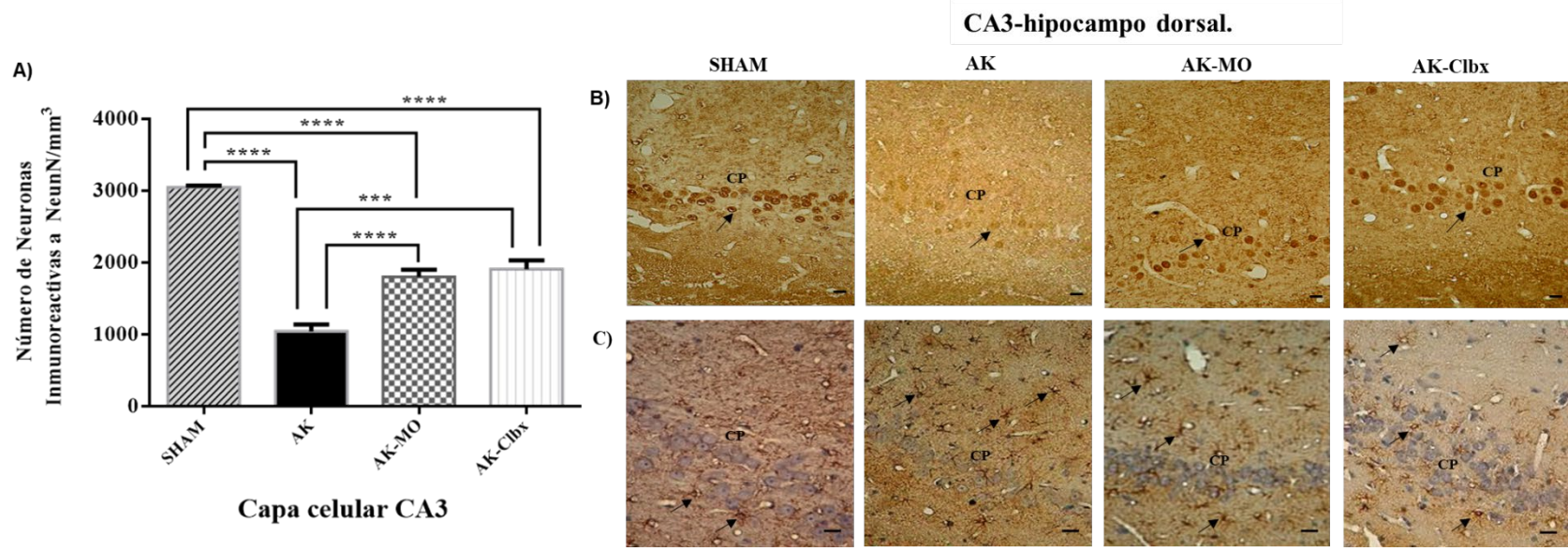


Fig. 32. CA3 de hipocampo dorsal al día 90 PN: A) Gráfica que muestra el promedio \pm error estándar (EE) del número de neuronas inmunorreactivas a NeunN, donde los grupos AK-MO y AK-C1bx muestran mayor preservación neuronal con diferencia significativa $****p < 0.0001$ y $***p < 0.001$ respectivamente, en comparación con el grupo AK, no obstante ambos grupos muestran menor número de neuronas preservadas con una diferencia significativa $****p < 0.0001$ en comparación con el grupo SHAM. B) Fotomicrografías de hipocampo dorsal (40x) que muestran neuronas inmunorreactivas a Neun N en la región CA3 en los diferentes grupos, donde se observa mayor preservación neuronal en los grupos AK-MO y AK-C1bx en comparación con el grupo AK. (CP-Capa Piramidal). Barra de calibración, 20 μ m. C) Fotomicrografías de hipocampo dorsal (40x) que muestra células inmunorreactivas a GFAP (contrastada con hematoxilina) en los diferentes grupos control y experimental, donde se observa la presencia de gliosis reactiva en la región de CA3 siendo mayor en los grupos AK, AK-MO y AK-C1bx en comparación con los grupos SHAM (CP-Capa piramidal). Barra de calibración, 25 μ m.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba de Bonferroni's, $p < 0.05$.

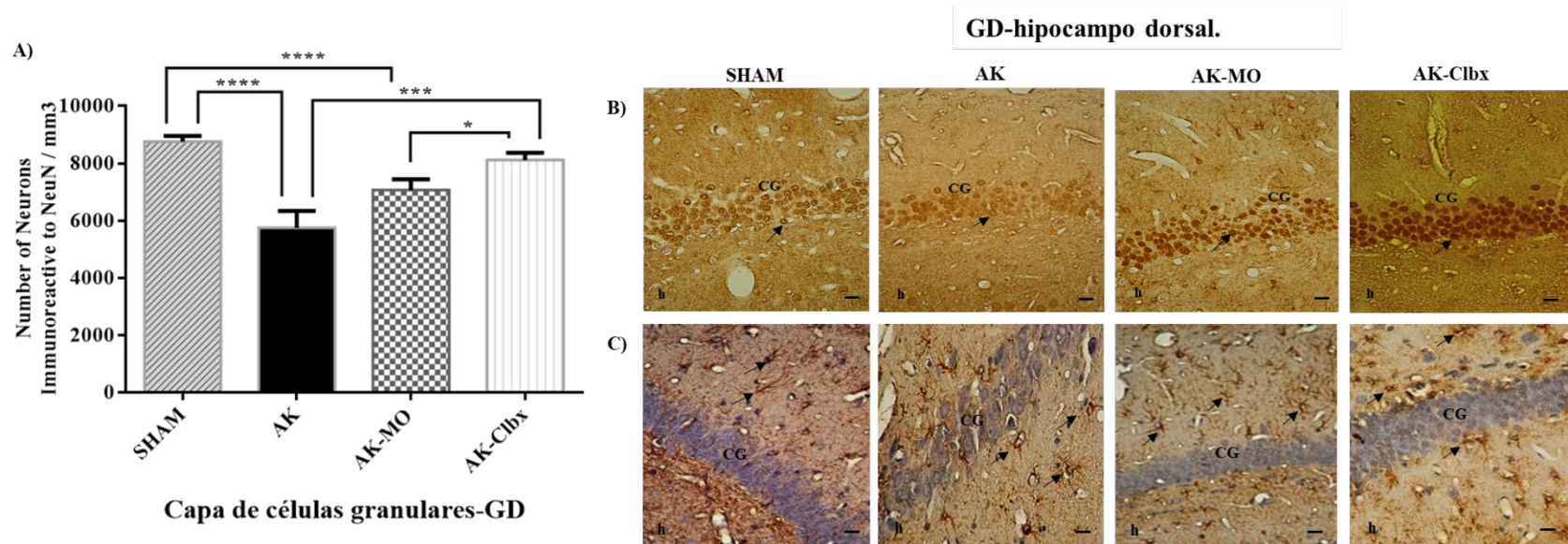


Fig. 33. Giro dentado (GD) del hipocampo dorsal al día 90 PN: Gráfica que muestra el promedio \pm error estándar (EE) del número de neuronas inmunorreactivas a Neun N, donde los grupos AK y AK-MO muestran mayor pérdida neuronal con una diferencia significativa $****p < 0.0001$ en comparación con el grupo SHAM; así mismo, el grupo AK-CIbx muestra mayor preservación neuronal con una diferencia significativa $***p < 0.001$ y $*p < 0.03$ en comparación con el grupo AK y AK-MO. B) Fotomicrografías de hipocampo dorsal (40x) que muestran neuronas inmunorreactivas a Neun N en la región GD en los diferentes grupos control y experimental, donde se observa mayor preservación neuronal en el grupo AK-CIbx en comparación con el grupo AK. (CG-Capa Granular). Barra de calibración, 20 μ m. C) Fotomicrografías de hipocampo dorsal (40x) que muestra células inmunorreactivas a GFAP (contrastada con hematoxilina), en los diferentes grupos control y experimental en la región de GD, donde se observa el incremento de gliosis reactiva en el grupo AK, AK-MO y AK-CIbx en comparación con los grupos SHAM. (CG-Capa Granular, H: hilus). Barra de calibración, 25 μ m.

ANOVA de una vía seguido de un post prueba de Bonferroni's, $p < 0.05$.

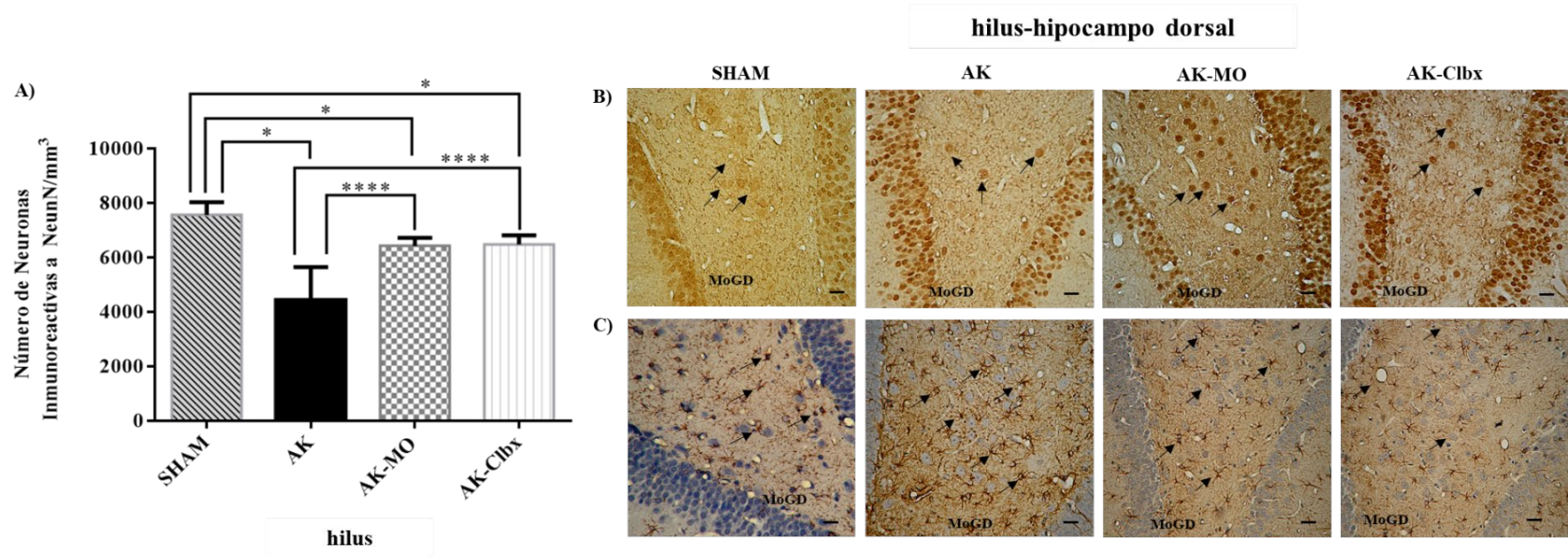


Fig. 34. Hilus de hipocampo dorsal al día 90 PN: A) Gráfica que muestra el promedio \pm error estándar (EE) del número de neuronas inmunorreactivas a Neun N, donde los grupos AK-MO y AK-Clbx muestran mayor preservación neuronal con una diferencia significativa $****p < 0.0001$ en comparación con el grupo AK; B) Fotomicrografías de hipocampo dorsal (40x) que muestran neuronas inmunorreactivas a Neun N en la región de hilus en los diferentes grupos control y experimental, donde se observa mayor preservación neuronal en los grupos AK-MO y AK-Clbx en comparación con el grupo AK. (CG-Capa Granular). Barra de calibración, 20 μ m; C) Fotomicrografías de hipocampo ventral (40x) que muestra células inmunorreactivas a GFAP (contrastada con hematoxilina) en los diferentes grupos control y experimental, donde se observa la presencia de gliosis reactiva en la región de GD, siendo mayor en el grupo AK, en comparación con los grupos AK-MO, AK-Clbx y SHAM (MoCG-Capa Granular, h: hilus). Barra de calibración, 25 μ m.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba de Bonferroni's, $p < 0.05$.

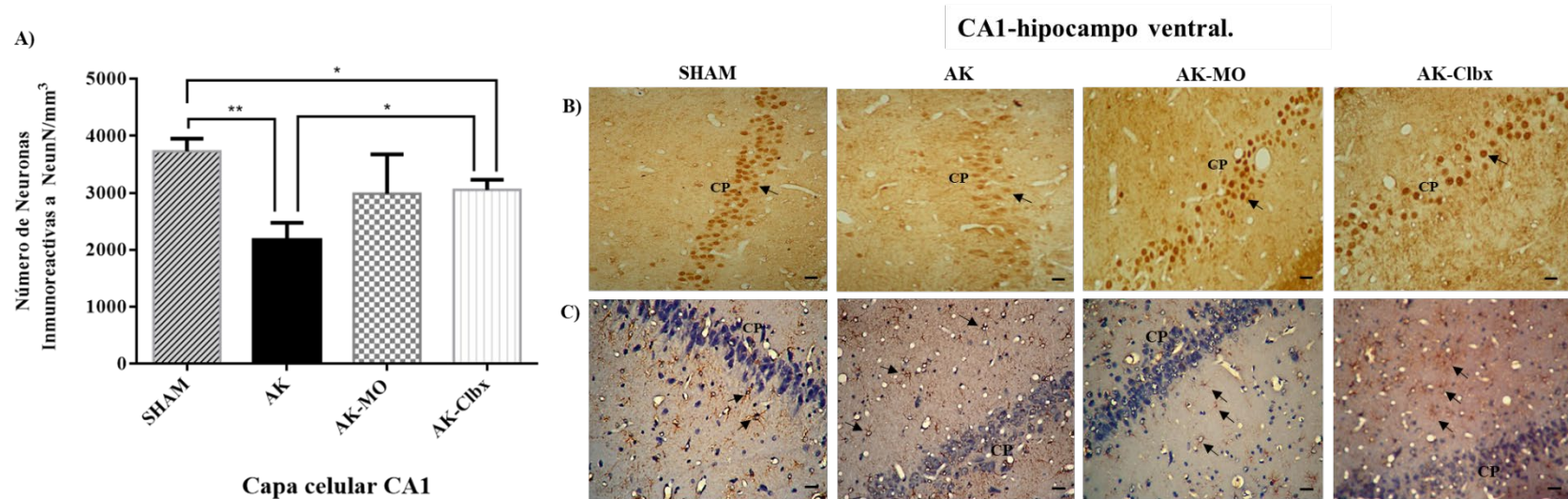


Fig. 35. CA1 de hipocampo ventral al día 90 PN: A) Gráfica que muestra el promedio \pm error estándar (EE) del número de neuronas inmunorreactivas a Neun N, donde el grupo AK-MO no muestra diferencias significativas en el número de neuronas preservadas con respecto a los demás grupos. Por otra parte, el grupo AK-Clbx muestra mayor preservación neuronal con una diferencia significativa $*p < 0.01$ en comparación con el grupo AK, ambos grupos AK y AK-Clbx muestran menor preservación neuronal con una diferencia significativa $**p < 0.001$ en comparación con el grupo SHAM. B) Fotomicrografías de hipocampo ventral (40x) que muestran neuronas inmunorreactivas a Neun N en CA1 (CP-Capa piramidal) donde se muestra mayor preservación neuronal en el grupo AK-Clbx. Barra de calibración, 25 μ m. C) Fotomicrografías de hipocampo ventral (40x) que muestra células inmunorreactivas a GFAP (contrastada con hematoxilina) en los diferentes grupos control y experimental, donde se observa la presencia de gliosis reactiva en la región de CA1, siendo mayor en el grupo AK, en comparación con el grupo SHAM AK-MO y AK-Clbx (CP-Capa piramidal). Barra de calibración, 25 μ m.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba de Bonferroni's, $p < 0.05$.

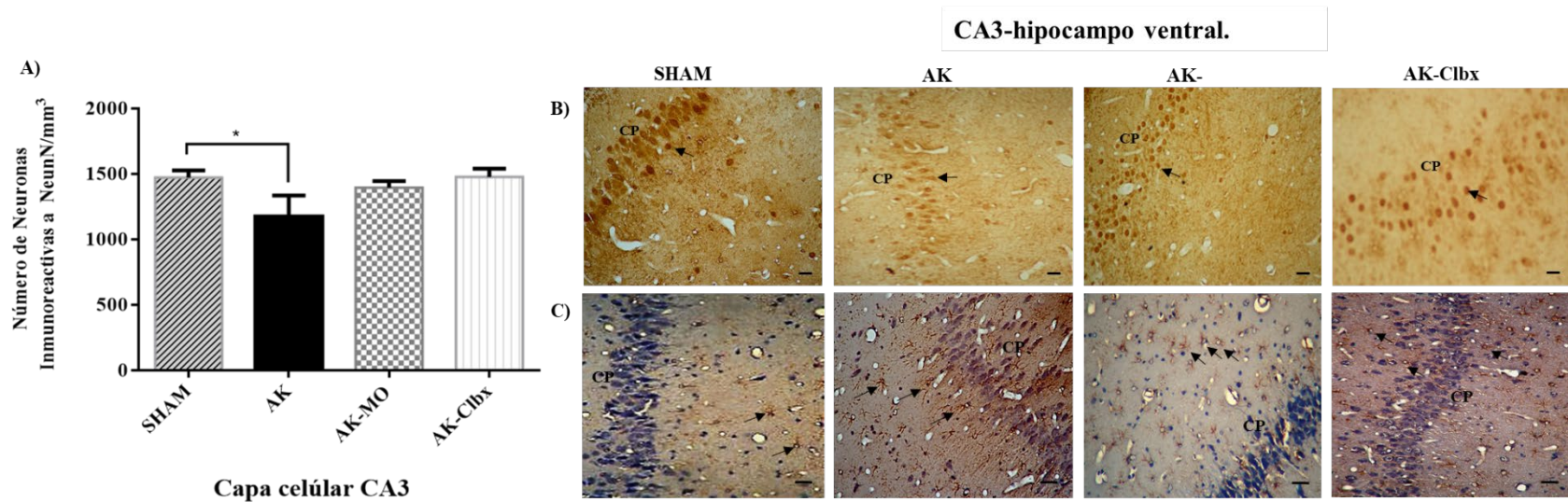


Fig. 36. CA3 de hipocampo ventral al día 90 PN: A) Gráfica que muestra el promedio \pm error estándar (EE) del número de neuronas inmunorreactivas a Neun N, donde los grupos AK-MO y AK-Clbx no muestran diferencias significativas en comparación con los grupos AK y SHAM, de igual forma, el grupo AK un número menor de neuronas preservadas con una diferencia significativa $*p < 0.01$ en comparación con el grupo SHAM. B) Fotomicrografías de hipocampo ventral (40x) que muestran neuronas inmunorreactivas a Neun N en CA3 (CP-Capa piramidal) en los diferentes grupos control y experimental. Barra de calibración, 25 μ m. C) Fotomicrografías de hipocampo ventral (40x) que muestra células inmunorreactivas a GFAP (contrastada con hematoxilina) en los diferentes grupos control y experimental, donde se observa la presencia de gliosis reactiva en la región de CA3, siendo mayor en el grupo AK en comparación con el grupo SHAM, AK-MO y AK-Clbx (CP-Capa piramidal). Barra de calibración, 25 μ m.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba de Bonferroni's, $p < 0.05$.

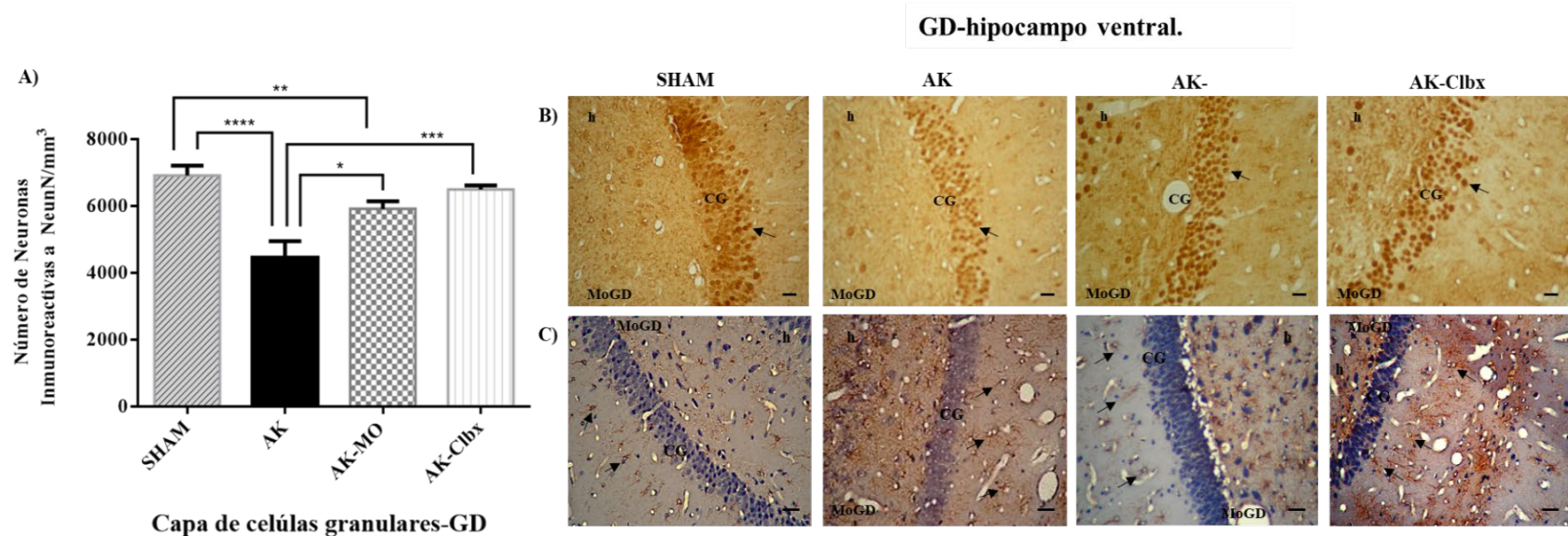


Fig. 37. Giro dentado (GD) de hipocampo ventral al día 90 PN: A) Gráfica que muestra el promedio \pm error estándar (EE) del número de neuronas inmunorreactivas a Neun N, donde los grupos AK-MO y AK-Clbx muestran mayor preservación neuronal con una diferencia significativa $***p < 0.001$ y $*p < 0.01$ respectivamente, en comparación con el grupo AK, por otra parte, el grupo AK-MO muestra menor número de neuronas preservadas con una diferencia significativa $**p < 0.001$ en comparación con el grupo SHAM; B) Fotomicrografías de hipocampo ventral (40x) que muestran neuronas inmunorreactivas a Neun N en GD (CG- Capa granular), donde se muestra mayor preservación neuronal en los grupos AK-MO y AK-Clbx en comparación con el grupo AK. Barra de calibración, 25 μ m; C) Fotomicrografías de hipocampo ventral (40x) que muestra glía inmunorreactiva a GFAP (contrastada con hematoxilina) en los diferentes grupos control y experimental, donde se observa la presencia de gliosis reactiva en la región de GD, siendo mayor en el grupo AK, AK-MO, AK-Clbx en comparación el grupo SHAM (CG-Capa Granular). Barra de calibración, 25 μ m.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba de Bonferroni's, $p < 0.05$.

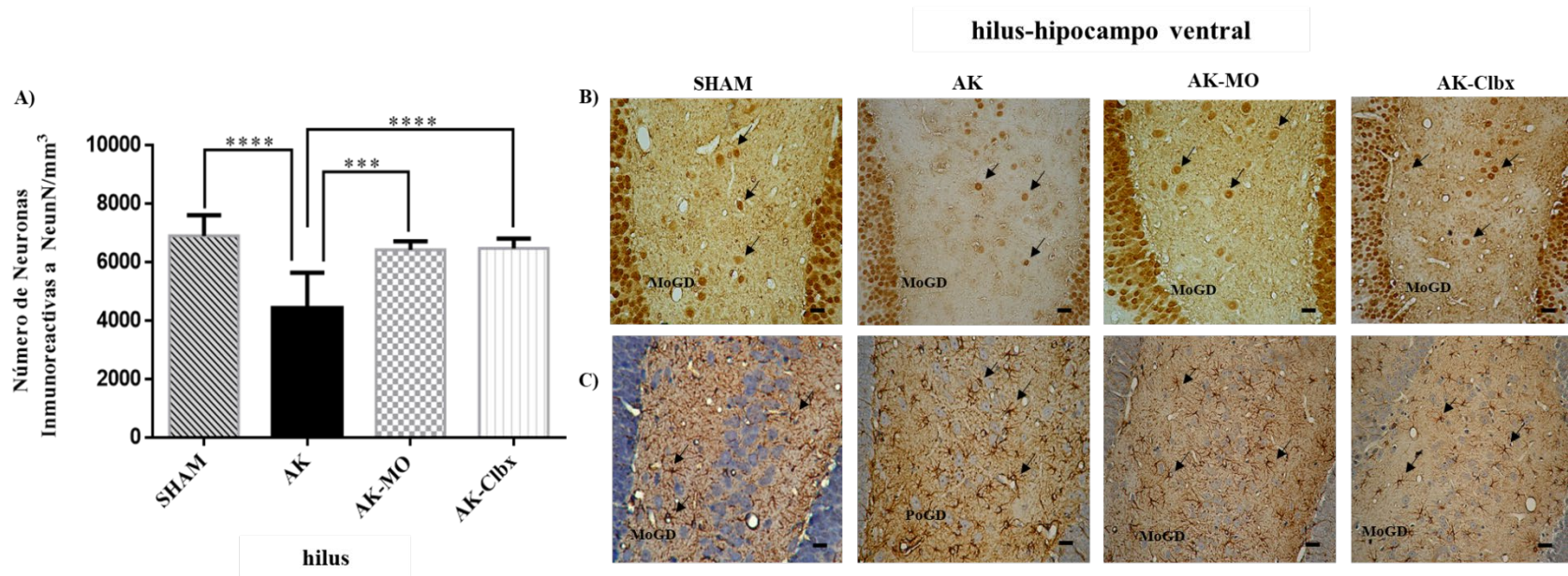


Fig. 38. Hilus de hipocampo ventral al día 90 PN: A) Gráfica que muestra el promedio \pm error estándar (EE) del número de neuronas inmunoreactivas a NeunN, donde los grupos AK-MO y AK-CIbx muestran mayor preservación neuronal con una diferencia significativa $***p < 0.001$ y $****p < 0.0001$ respectivamente en comparación con el grupo AK. B) Fotomicrografías de hipocampo dorsal (40x) que muestran neuronas inmunoreactivas a Neun N en la región de hilus donde se muestra mayor preservación neuronal en los grupos AK-MO y AK-CIbx, en comparación con el grupo AK. (CG-Capa Granular). Barra de calibración, 20 μ m. C) Fotomicrografías de hipocampo ventral (40x) que muestra células inmunoreactivas a GFAP (contrastada con hematoxilina) en los diferentes grupos control y experimental, donde se observa la presencia de gliosis reactiva en la región de GD, siendo mayor en el grupo AK, AK-MO, AK-CIbx en comparación con el grupo SHAM (MoCG-Capa Granular, h: hilus). Barra de calibración, 25 μ m.

ANOVA de una vía seguido de una post prueba de Bonferroni's, $p < 0.05$.

10.- DISCUSIÓN.

El uso de modelos de *Status epilepticus* recurrente en ratas inmaduras, nos permite observar a corto y largo plazo la evolución del daño excitotóxico y los mecanismos celulares que se ponen en marcha, para restaurar la función normal de las redes neuronales. La neuroinflamación, es la respuesta del sistema inmune, orquestada por la microglía y astrocitos, dirigida a resarcir el daño neuronal y recuperar la homeostasis celular, sin embargo, si esta respuesta neuroinflamatoria no es modulada en tiempo y magnitud, la activación de mediadores inflamatorios como: IL1- β , Cox-2, iNOS, NF κ - β y TNF- α , generan cambios en la hiperexcitabilidad neuronal que causan muerte neuronal y la activación recurrente de mediadores proinflamatorios, que promueven el desarrollo de epileptogenesis y el establecimiento de una epilepsia en etapas posteriores (Vezzani y cols., 2011;2015).

En nuestros resultados del análisis por Western blot en tejido de hipocampo, post modelo de *Status epilepticus* recurrente inducido por AK, observamos el incremento de las proteínas: IL1- β , Cox-2, iNOS, TNF- α y NF κ - β en hipocampo. Se ha reportado que la vía de la IL1- β , promueve la activación de NF κ - β , que induce la transcripción de Cox-2 y su vez favorece la producción de PGE2 e iNOS, los cuales incrementa la liberación y la inhibición de la recaptura de glutamato en la sinapsis, así como el incrementó de la afinidad de los NMDARs, que promueven el flujo de Ca⁺² intracelular y es responsable de la disminución del umbral convulsivo. De la misma forma, el incremento de PGE2, activa la liberación de TNF- α por los astrocitos, lo que favorece la liberación de glutamato, el incremento de la afinidad de los AMPARs y la subsecuente generación de actividad epileptiforme (Auvin y cols., 2003; Vezzani y cols., 2005; Ravizza y cols., 2008).

El tratamiento con una sola dosis de MO, disminuyó la expresión de las proteínas IL1- β y Cox-2 a las 6 y 24 h; y TNF- α a las 24 h de forma similar, a lo observado en el grupo tratado con Clbx. Se ha reportado que, los mecanismos antiinflamatorios de la MO se vinculan a la inhibición de la producción de ON y la expresión de IL1- β , iNOS, Cox-2, TNF- α , PGs, tromboxanos y leucotrienos, actuando directamente sobre la vía de MAPKs, y en especial de NF κ - β (Zhou y cols., 2008; Chuang y cols., 2013). Así mismo, se ha reportado en modelos *in vitro* en macrófagos los efectos antioxidantes del honokiol y magnolol, por medio de la inhibición de la síntesis de iNOS (Lee y cols., 2005) y sobre la disminución de la producción de citocinas proinflamatorias en células THP-1, observado en el modelo de shock séptico inducido por endotoxina (Lee y cols., 2005; Lee y cols., 2011). Adicionalmente, en un modelo de activación de macrófagos y monocitos, derivados de células dendríticas en humanos inducido por LSP, el magnolol y honokiol ejercieron un efecto antiinflamatorio derivado de la inhibición de iNOS (Li y cols., 2011). Así mismo, en un modelo *in vivo*, de inflamación y tumorigénesis de piel en ratones, se ha reportado que el magnolol tiene efectos antiinflamatorios, mediados por la inhibición de la producción del activador tisular del plasminógeno (ATP) (Kuo y cols., 2010).

En el análisis de la expresión de iNOS, en el grupo que recibió tratamiento con MO, se observó que una sola dosis de MO, disminuye su expresión a las 6 h, sin embargo, incrementó nuevamente a las 24 h post tratamiento, mostrando niveles similares al grupo tratado únicamente con AK. El tratamiento con una dosis única de MO, no mostró diferencias significativas en la expresión de NF κ - β . Lai (2011) reportó el efecto antiinflamatorio de la MO en un estudio *in vitro*, en cultivo de macrófagos con la línea celular RAW264, estimulados por LPS y retados con magnolol, a una concentración de 5 y 10 μ M, donde se observó, la inhibición de iNOS y

Cox-2 con la subsecuente disminución de la producción de ON y PGE2, lo que sugiere que el magnolol inhibe la actividad intrínseca de la enzima iNOS, se disminuye la producción de ON, que a su vez, disminuye la expresión de Cox-2; ambas enzimas son clave para la producción de ON y PGE2, respectivamente. Dicho efecto fue evaluado por Western blot y probado por PCR tiempo real, donde se observó la disminución de la expresión de ARNm de iNOS y Cox-2. Lo que sugiere que el magnolol puede inhibir la expresión de iNOS y Cox-2 a través de mecanismos transcripcionales sobre la vía de señalización de IL1- β / NF κ - β , mediante la supresión de la traslocación de NF κ - β al núcleo. Lo anterior es crítico para la regulación de la síntesis de las proteínas inflamatorias iNOS, Cox-2 y TNF- α . De la misma forma, Tse (2005) reportó que el tratamiento subcrónico con magnolol y el honokiol inhibe la traslocación al núcleo de las proteínas p50 y p65 de NF κ - β , mediante la inhibición de la fosforilación del factor nuclear del potenciador génico del polipéptido ligero kappa en el inhibidor de las células B-alfa (I κ B α), por medio de la supresión de la activación de la quinasa I κ B (IKK). Complejo enzimático que participa en la propagación de la respuesta neuroinflamatoria. Lo anterior, sustenta que el efecto antiinflamatorio de la MO, actúa sobre la regulación de la actividad del NF κ - β y que el mantenimiento de este efecto antiinflamatorio es dependiente de la dosis y de la frecuencia del tratamiento con MO (Tse y cols., 2005; 2007; Lai y cols., 2011).

En nuestros resultados, la evaluación del efecto neuroprotector del tratamiento subcrónico de MO, post modelo de status epilepticus recurrente, al día 30 PN, se observó mayor número de neuronas preservadas en las áreas de CA1, CA3 y GD de hipocampo dorsal, y de CA1 y CA3 en hipocampo ventral. Dicho efecto, fue similar en el grupo que recibió Clbx. Ambos tratamientos mostraron mayor número de neuronas preservadas, en comparación con el

grupo AK. Estudios previos sobre el efecto neuroprotector de la inhibición de Cox-2 por medio de administración de Clbx, vía oral, post status epilepticus inducido con AK, mostró mayor preservación neuronal en la región CA3 de hipocampo dorsal (Gobbo y cols, 2004b).

En el análisis por inmunohistoquímica de GFAP, sólo el grupo con tratamiento con MO, mostró menor presencia de gliosis en CA3 y a nivel del hilus en el hipocampo dorsal. Mientras que, ambos grupos de los tratamientos con MO y Clbx, presentaron menor gliosis en las regiones de CA1 y GD de hipocampo ventral, en comparación con el grupo AK. Lo que sugiere que el tratamiento subcrónico de la MO ejerció un efecto antiinflamatorio similar al Clbx y que, a su vez, generó un efecto neuroprotector sobre el daño inducido por el status epilepticus recurrente, en el hipocampo, al modular la respuesta neuroinflamatoria (Fig. 39). Este efecto neuroprotector a su vez, ha sido reportado previamente en modelos de isquemia cerebral en ratas, donde se observó, que la reducción del área de penumbra está ligado al efecto antiinflamatorio por la disminución de Cox-2 y ROS (Liou y cols., 2003ab; Lin y cols., 2003; Talarek y cols., 2017).

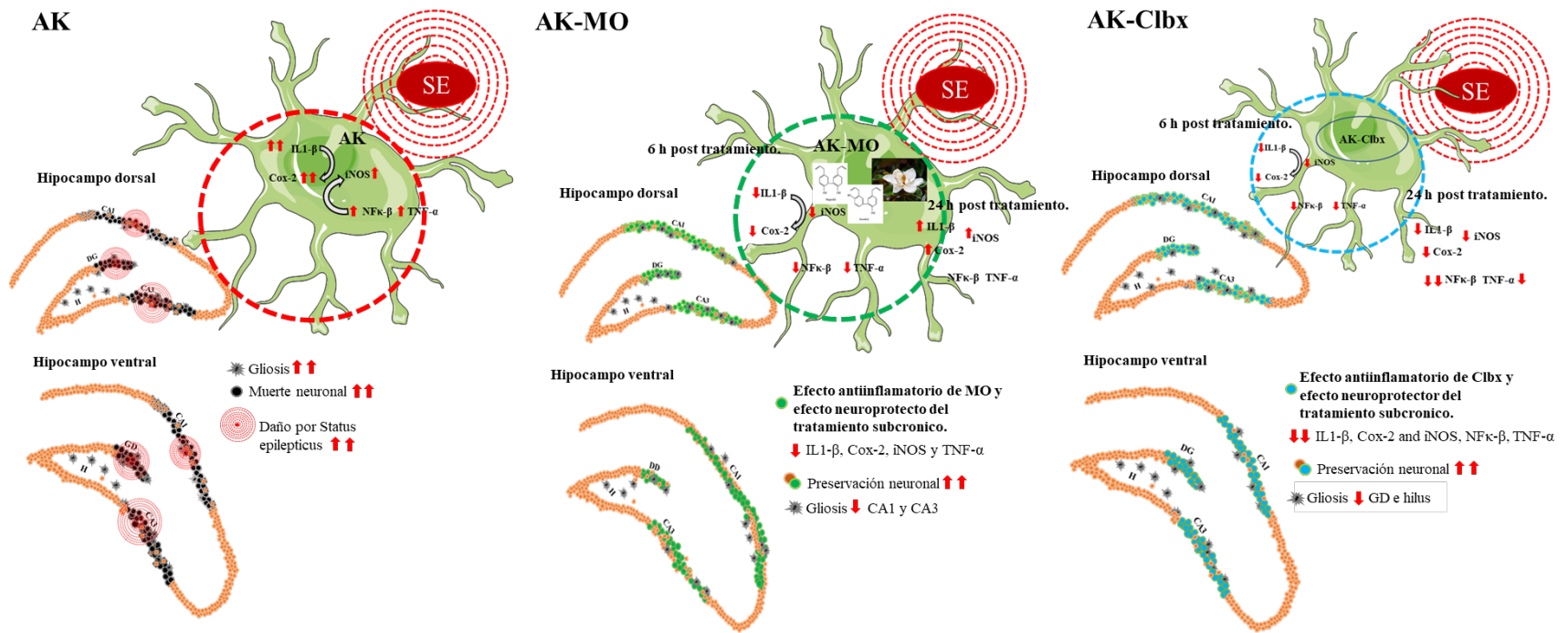


Fig. 39. Imagen representativa del efecto antiinflamatorio y neuroprotector del tratamiento con MO al día 30 PN: que muestra la participación de la microglía y astrocitos en la activación de la vía de la IL1-β, por el daño excitotóxico generado por el status epilepticus. **A)** Se muestra el incremento de las proteínas proinflamatorias: IL1-β, Cox-2, iNOS, NF-κβ y TNFα, así como la muerte neuronal y gliosis en las áreas de CA1, CA3, GD e hilus en el hipocampo dorsal y ventral. **B)** Efecto antiinflamatorio del tratamiento con MO, donde se muestra una reducción de la expresión de IL1-β, Cox-2 a las 6 y 24 h e iNOS a las 6 h post tratamiento con MO, sin embargo, muestra un incremento a las 24 h. No obstante lo anterior, el tratamiento subcrónico con MO (300 mg/Kg durante 10 días) mostró un efecto neuroprotector y menor expresión de gliosis en las áreas de CA1, CA3 y GD de hipocampo dorsal y ventral. **C)** Efecto antiinflamatorio del tratamiento con Clbx, donde se muestra una reducción de la expresión de IL1-β, Cox-2, iNOS a las 6 h y 24 h manteniendo una disminución de NF-κβ y TNFα a las 24 h post tratamiento, el tratamiento subcrónico con Clbx (20 mg/Kg 10 días) muestra un efecto neuroprotector y menor expresión de gliosis en las áreas de CA1, CA3 y GD de hipocampo dorsal y ventral.

En la evaluación del efecto neuroprotector del tratamiento subcrónico con MO, sobre la susceptibilidad convulsiva, al día 90 PN (76 días post modelo de status epilepticus recurrente). En el análisis de la actividad electroencefalográfica, el grupo SHAM mostró actividad homogénea en todas las bandas (0.1–4 Hz delta, 4–8 Hz teta, 8–13 Hz alfa, 13–30 Hz beta y 30–90 Hz gamma) bajo condiciones basales. Por el contrario, el grupo AK mostró actividad en las bandas 0.1–4 Hz delta, 4–8 Hz teta y 13–30 Hz beta y un incremento de las bandas 8–13 Hz alfa y 30–90 Hz gamma, lo cual es asociado a hiperexcitabilidad neuronal bajo condiciones basales (Santos y cols., 2000b; Csicsvari y cols., 2003). De igual forma, los grupos que recibieron tratamiento con MO y Clbx, mostraron oscilaciones de baja frecuencia y actividad homogénea en las bandas 0.1–4 Hz delta, 4–8 Hz teta y 8–13 Hz alfa, con un incremento en la actividad de la banda 13–30 Hz beta. Este efecto fue previamente reportado en el uso de AINEs, donde se observa el predominio de oscilaciones de baja frecuencia (Csicsvari y cols., 2003; Temp y cols., 2017).

Durante la determinación del UPD, el grupo que sólo recibió el AK, mostró una disminución en los valores subumbrales, siendo estos menores en comparación con el grupo control SHAM, lo cual demuestra una susceptibilidad a la hiperexcitabilidad neuronal, además, de que el 70% de las ratas del grupo que recibió únicamente AK, generó actividad convulsiva de tipo tónico clónica (fase V en la escala de Racine modificada). No obstante lo anterior, los grupos tratados con MO y Clbx, a pesar de mostrar valores subumbrales por debajo del grupo SHAM, en la evaluación de la conducta motora durante la determinación del UPD, el 100% de los animales de los grupos que recibieron tratamiento con MO y Clbx presentaron únicamente sacudidas de perro mojado correspondiente a una Fase I en la escala de Racine (Racine 1972;

Santana-Gómez y cols., 2017). Lo que sugiere la presencia un foco epileptogénico en el hipocampo, producto del daño inducido por el Status epilepticus recurrente durante la etapa inmadura. Sin embargo, la intervención temprana sobre la respuesta neuroinflamatoria con los tratamientos a base de MO y Clbx, preservó las regiones de CA1, CA3 y GD de hipocampo ventral, así como estructuras adyacentes al hipocampo, lo que, a su vez, inhibió la propagación de la hiperexcitabilidad neuronal (Moshe y cols., 1983; Druga y cols., 2005; 2010; Mareš y cols., 2016). Por otra parte, la actividad convulsiva observada en el grupo AK, puede asociarse al daño en CA1 y GD, el cual es una puerta de entrada a la generación de actividad convulsiva (Fujikawa y cols., 2000; Csicsvari y cols., 2003).

En el análisis de la actividad electroencefalográfica posterior a la determinación del UPD, el grupo AK mostró mayor actividad en las bandas 0.1-4 Hz delta, 4-8 Hz teta y 8-13 Hz alfa, con una disminución en las oscilaciones de alta frecuencia de 30-90 Hz gamma, respuesta que está asociada con la actividad postictal (Valdes-Cruz y cols., 2012; Santana-Gómez y cols., 2017). Lo cual también se observó en el análisis espectral, caracterizado por actividad sincrónica correspondiente a actividad epileptiforme en respuesta al estímulo subumbral (Stafstrom y cols., 1993; Schlichtiger y cols., 2010; Borham y cols., 2016).

Así mismo los grupos tratados con MO y Clbx mostraron actividad homogénea de las bandas 0.1-4 Hz delta, 4-8 Hz teta y de 8-13 Hz alfa, similar a lo observado en el período de basal, aunque con un aumento en la actividad de la banda 13-30 Hz beta y disminución la actividad de la banda 30-90 de Hz gamma, similar a lo ocurrido en el grupo AK. De la misma forma, en el análisis espectral, los tratamientos con MO y Clbx mostraron actividad de baja frecuencia similar a lo ocurrido en el periodo basal. Se ha reportado que esta disminución en la

potencia de la banda de 30 a 90 Hz gamma en el hipocampo, está asociada con un incremento en la liberación de GABA inducido por la hiperexcitabilidad neuronal, que actúa como un mecanismo compensatorio para suprimir la activación de las neuronas glutamatérgicas y para mantener el equilibrio entre la excitación y la inhibición (Rosillo-de la Torre y cols., 2015).

De igual forma, la actividad convulsiva observada en el grupo que sólo recibió el AK, se asocia a daño en el GD y CA1 del hipocampo ventral durante la etapa inmadura, donde se ha reportado que, en respuesta a la pérdida neuronal, el cerebro inmaduro promueve la neurogénesis en estructuras como el hipocampo, así como la reorganización sináptica y la formación de fibras musgosas principalmente en CA1, CA3 y el subículum de hipocampo dorsal y ventral, lo que permite la generación de actividad epileptiforme (Cavazos y cols., 2004; Devin y cols., 2007).

Dichos resultados correlacionan con los datos observados por medio del análisis por inmunohistoquímica de Neun N, donde el grupo que solo recibió AK mostró mayor pérdida neuronal en las áreas de CA1, CA3, GD e hilus de hipocampo dorsal, así como en CA1 y GD el hipocampo ventral en principalmente, acompañado de una mayor expresión de gliosis (Penkowa y cols., 2001). Lo anterior, se asocia a la disminución de los valores del UPD con la subsecuente generación de actividad convulsiva. A su vez, este incremento en la susceptibilidad convulsiva, está ligado a la respuesta neuroinflamatoria orquestada por la activación de la vía de la IL1- β y al incremento de las proteínas Cox-2, iNOS, TNF- α y NF κ - β durante el periodo inmaduro (Auvin y cols., 2003; Ravizza y cols., 2005; 2006; Vezzani y cols., 2013).

Con base a los resultados obtenidos, los tratamientos con MO y Clbx ejercieron un efecto antiinflamatorio y neuroprotector en la etapa inmadura, los cuales favorecieron una mayor preservación neuronal en las regiones de CA1, CA3, GD e hilus del hipocampo dorsal y ventral con menor expresión de gliosis en la etapa adulta. Lo cual, puede ser responsable de la inhibición en la propagación de la actividad convulsiva durante la determinación del UPD.

Así mismo, se estima que el tratamiento con MO posee efectos neuroprotectores ligados a sus efectos antiinflamatorios sobre la vía de la IL1- β y la disminución de Cox-2, iNOS, TNF- α y NF κ - β , similar al grupo que recibió Clbx. Aunque dicho efecto no evitó la generación de un foco epileptogénico, observado en los valores subumbrales menores durante la evaluación del UPD, los cuales fueron similares al grupo que sólo recibió AK. Sin embargo, la administración de la MO protegió estructuras del hipocampo responsables de la propagación de la hiperexcitabilidad neuronal como CA3 y GD (Penkowa y cols., 2001; Druga y cols., 2005; Chen y cols.,2011) (Fig. 40).

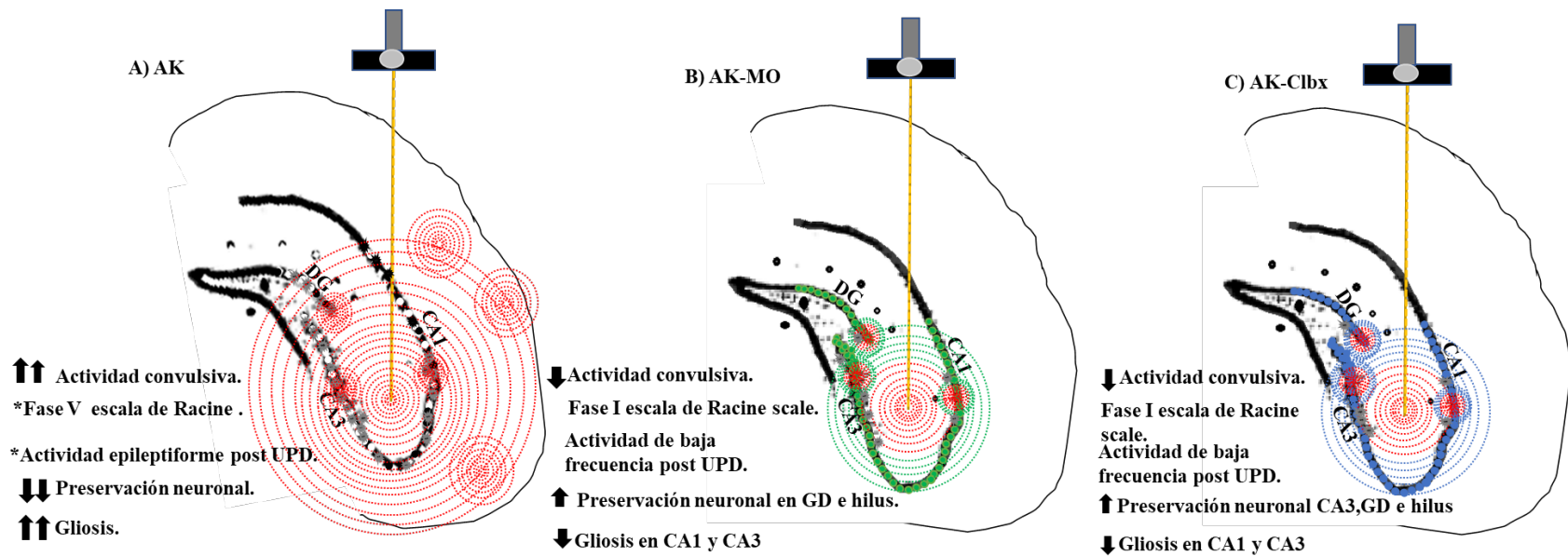


Fig. 40.- Efecto neuroprotector del tratamiento con MO sobre la susceptibilidad convulsiva al día 90 PN: A) Determinación de UPD en el grupo AK donde se observa propagación de la hiperexcitabilidad neuronal. **B)** Determinación de UPD en el grupo AK-MO donde en tonos verdes se observa las áreas preservadas con el tratamiento subcrónico de MO en hipocampo ventral y la inhibición de la propagación de la hiperexcitabilidad neuronal. **C)** Determinación de UPD en el grupo AK-Clbx donde en tonos azules se observan las áreas preservadas con el tratamiento subcrónico de Celecoxib en hipocampo ventral y la inhibición de la propagación de la hiperexcitabilidad neuronal.

11.- CONCLUSIÓN.

El tratamiento subcrónico de MO post modelo de *Status epilepticus* recurrente inducido por AK, mostró un efecto neuroprotector en el cerebro inmaduro, ligado a un efecto antiinflamatorio similar al Clbx, observado en mayor preservación neuronal y menor expresión de gliosis sobre las áreas CA1, CA3 y GD de hipocampo y sobre la inhibición de la propagación de la hiperexcitabilidad neuronal durante la evaluación de la susceptibilidad convulsiva en la etapa adulta. Debido a lo anterior, la MO podría ser una alternativa de tratamiento antiinflamatorio y neuroprotector sobre la epileptogenesis, en etapas tempranas del desarrollo. No obstante, hacen falta más estudios acerca de su mecanismo como antiinflamatorio en el cerebro inmaduro, sobre el efecto de su uso crónico en el neurodesarrollo y de los posibles efectos secundarios.

12.- PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, nuestro interés del efecto de la MO como posible tratamiento neuroprotector sobre la epileptogénesis, nos orienta a identificar su mecanismo antiinflamatorio exacto y los efectos de su administración en combinación con otros fármacos con potencial neuroprotector. Adicionalmente, es de nuestro interés el evaluar los efectos de la MO como modulador de estrés oxidativo y de la actividad de Cox-2 en el cerebro inmaduro, así como su efecto neuroprotector en tálamo y corteza cerebral (estructuras encargadas de la propagación de la actividad epileptiforme). De igual forma, es de nuestro interés continuar con el estudio del efecto del tratamiento crónico con MO y su efecto sobre el neurodesarrollo normal. Así mismo, sus posibles efectos secundarios sobre el desarrollo motor, los procesos de memoria y aprendizaje

13.- BIBLIOGRAFÍA.

- Ai, J., Wang, X., Nielsen, M. (2001). Honokiol and magnolol selectively interact with GABAA receptor subtypes in vitro. *Pharmacology*. 63(1):34-41.
- Akin, D., Ravizza, T., Maroso, M., Carcak, N., Eryigit, T., Vanzulli, I., et al. (2011) IL-1 β is induced in reactive astrocytes in the somatosensory cortex of rats with genetic absence epilepsy at the onset of spike-and-wave discharges, and contributes to their occurrence. *Neurobiol Dis*. 44(3):259-69.
- Albala, B.J., Moshé, S.L., and Okada, R. (1984). Kainic-acid-induced seizures: a developmental study. *Dev Brain Res*.13: 139–148.
- Alexeev, M., Grosenbaugh, D.K., Mott, D.D., Fisher, J.L. (2012). The natural products magnolol and honokiol are positive allosteric modulators of both synaptic and extra-synaptic GABA(A) receptors. *Neuropharmacology*. 62(8):2507–14.
- Anguelova, E., Smirnova, T. (2000). Differential expression of small heat shock protein 27 in the rat hippocampus and septum after fimbria-fornix lesion. *Neurosci Lett*. 18;280(2):99-102.
- Antman, E.M., Bennett, J.S., Daugherty, A.F., Curt, R.H., Taubert, K.A. (2007). Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update for clinicians: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation American Heart Association*. 115 (12): 1634-1642.
- Araujo, D., Karsena, T., and Kaoru, S. (2019). The Endocannabinoid System as a Window into Microglial Biology and Its Relationship to Autism. *Front Cell Neurosci*. 13: 424.

- Aronica, E., Boer, K., van Vliet, EA., Redeker, S., Baayen, JC., Spliet, WG., et al. (2007). Complement activation in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* 26(3):497-511.
- Auvin, S., Mazarati, A., Shin, D., Sankar, R. (2010). Inflammation Enhances Epileptogenesis in the Developing Rat Brain. *Neurobiol Dis.* 40(1):303-10.
- Auvin, S., Dupuis, N. (2014). Outcome of status epilepticus. What do we learn from animal data? Prolonged epileptic seizures: Identification and treatment. *Epileptic disorder.* 16(1): S37-S43.
- Auvin, S., Shin, D., Mazarati, A., Nakagawa, J, A., Miyamoto, J., Sankar R. (2007). Inflammation Exacerbates Seizure-Induced Injury in the Immature Brain. *Epilepsia.* 5:27-34.
- Barba, E.J. (2014). “Plasmaféresis y recambio plasmático”. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt143h.pdf>
- Bhala, N., Aithal, G., Ferguson, J. (2013). How to tackle rising rates of liver disease in the UK *BMJ.* 8;346: f807.
- Blair, R.E., Sombati, S., Lawrence, D.C., McCay, B.D., De Lorenzo, R.J. (2004). Epileptogenesis causes acute and chronic increases in GABAA receptor endocytosis that contributes to the induction and maintenance of seizures in the hippocampal culture model of acquired epilepsy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310:871–880.
- Baud, O., Saint-Faust, M. (2019). Neuroinflammation in the Developing Brain: Risk Factors, Involvement of Microglial Cells, and Implication for Early Anesthesia. *Review Anesth Analg.* 128(4):718-725.

- Beattie, E.C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J.C., et al. (2002). Control of synaptic strength by glial TNF alpha. *Science*. 295:2282–2285. 26.
- Beattie, M.S., Ferguson, A.R., Bresnahan, J.C. (2010). AMPA-receptor trafficking and injury-induced cell death. *Eur J Neurosci*. 32(2):290-7.
- Ben-Ari, Y., Holmes, G.L. (2006). Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *Lancet Neurol*. 5(12):1055-63.
- Ben-Ari, Y. (1981). Epilepsy: changes in local glucose consumption and brain pathology produced by kainic acid. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 27:385-94.
- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci*. 3(9):728-39.
- Ben-Ari, Y. (2014). The GABA excitatory /inhibitory developmental sequence: a personal journey. *Neuroscience*. 24; 279:187-219.
- Ben-Ari, Y., Cossart, R. (2000). Kainate a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci. Review*. 23(11):580-7.
- Ben-Ari, Y., Tremblay, E., and Ottersen, O.P. (1985). Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. *Neuroscience*. 515–528.
- Ben-Ari, Y., Tremblay, E., Berger, M., and Nitecka, L. (1984). Kainic acid seizure syndrome and binding sites in developing rats. *Dev Brain Res*. 14: 284–288.
- Bender, R.A, Baram, T.Z. (2008). Hyperpolarization activated cyclic-nucleotide gated (HCN) channels in developing neuronal networks. *Review. Prog Neurobiol*. 86(3):129-40.

- Bessis, A., Béchade, C., Bernard, D., Roumier, A. (2007). Microglial Control of Neuronal Death and Synaptic Properties. *Review Glia*. 55(3):233-8.
- Benítez-Díaz, P., Miranda-Contreras, L., Mendoza-Briceño, R.V., Peña-Contreras, Z., Palacios-Prü, E. (2003). Prenatal and Postnatal Contents of Amino Acid Neurotransmitters in Mouse Parietal Cortex. *Comparative Study Dev Neurosci*. 25(5):366-74.
- Berger, M.L., Tremblay, E., Nitecka, L., Ben-Ari, Y. (1984). Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. III. Postnatal development of kainic acid binding sites in the limbic system. *Neuroscience*. 13(4):1095-104.
- Bernaskova, M., Schoeffmann, A., Schuehly, W., Hufner, A., Baburin, I., Hering, S. (2015). Nitrogenated honokiol derivatives allosterically modulate GABAA receptors and act as strong partial agonists. *Bioorg Med Chem*. 15;23(20):6757-62.
- Bessis, A., Bechade, C., Bernard, D., & Roumier, A. (2007). Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia*. 55(3), 233–8.
- Bezzi, P., Domercq, M., Vesce, S., Volterra, A. (2001). Neuron-astrocyte cross-talk during synaptic transmission: physiological and neuropathological implications. *Prog Brain Res*. 132:255-65.
- Bhala, N., Emberson, J., Merhi, A., Abramson, S., Arber, N., Baron, JA., Bombardier, C. et al. (2013). Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet (London, England)*. 382 (9894): 769-779.

- Blobel, G.C., Schiemann, W.P., Lodish, H.F. (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 4;342(18):1350-8.
- Blumenfeld, H. (2003). From molecules to networks: cortical/subcortical interactions in the pathophysiology of idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia.* 44: 2:7-15.
- Bordey, A., Sontheimer, H. (1998). Properties of human glial cells associated with epileptic seizure foci. *Epilepsy Res.* 32(1-2):286-303.
- Bourne, J.N., Harris, K.M. (2008). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci.* 31:47-67.
- Brooks-Kayal, A.R., Shumate, M.D., Jin, H., Rikhter, T.Y., Kelly, M.E., Coulter, D.A. (2001). Gamma-aminobutyric acid (A) receptor subunit expression predicts functional changes in hippocampal dentate granule cells during postnatal development. *J Neurochem.* 77:1266–1278.
- Cacheaux, L.P., Ivens, S., David, Y., Lakhter, A.J., Bar-Klein, G., Shapira, M., Heinemann, U., Friedman, A., Kaufer, D. (2009). Transcriptome profiling reveals TGF-beta signaling involvement in epileptogenesis. *J Neurosci.* 15;29(28):8927-35.
- Chao, C.C., Hu, S., Ehrlich, L., Peterson, P.K. (1995). Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Behav Immun.* 9:355–365.
- Cavazos, J.E., Jones, S.M., Cross, D.J. (2004). Sprouting and Synaptic Reorganization in the Subiculum and CA1 Region the Hippocampus in Acute and Chronic Models of Partial-Onset Epilepsy. *Neuroscience.* 126:675–686

- Cavalleiro, E.A., Riche, D.A., Le Gal, La Salle. (1982). Long-term Effects of Intrahippocampal Kainic Acid Injection in Rats: A Method for Inducing Spontaneous Recurrent Seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 53(6):581-9.
- Chang, C.P., Hsu, Y.C., Lin, M.T. (2003). Magnolol protects against cerebral ischaemic injury of rat heatstroke. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 30(5-6):387-92.
- Chang, D., Baram, T.Z. (1994). Status epilepticus results in reversible neuronal injury in infant rat hippocampus: novel use of a marker. *Brain Res Dev Brain Res.* 14;77(1):133-6.
- Chang-Mu, C., Jen-Kun, L., Shing-Hwa, L., Shoei-Yn, L.S. (2010). Characterization of neurotoxic effects of NMDA and the novel neuroprotection by phytopolyphenols in mice. *Behav Neurosci.* 124(4):541-53.
- Chen, C.M., Liu, S.H., Lin-Shiau, S.Y. (2007). Honokiol, a neuroprotectant against mouse cerebral ischaemia, mediated by preserving Na⁺, K⁺ ATPase activity and mitochondrial functions. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 101(2):108-16.
- Chen, H., Li, Q., Yao, X., Fan B.T., Yuan, S., Panaye, A., Doucet, J.P. (2004) CoMFA/CoMSIA/HQSAR and Docking Study of the Binding Mode of Selective Cyclooxygenase (COX-2) Inhibitors. *Review QSAR Comb Sci.* 23(1):36-55.
- Chen, K., Aradi, I., Thon, N., Eghbal-Ahmadi, M., Baram, T.Z., Soltesz, I. (2001). Persistently modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability. *Nat Med.* 7(3):331-7.

- Chen, Y., Wang, C., Xu, F., Ming, F., Zhang, H. (2019). Efficacy and Tolerability of Intravenous Immunoglobulin and Subcutaneous Immunoglobulin in Neurologic Diseases. *Clin Ther.* 41(10):2112-2136.
- Cheng, Y., Nuan, J., Lin, Z., Ming, G, Xhu-Xin, Y. (2003). Impairment of kidney induced y methanol extract of *Magnolia officinalis* after single or chronic administration in mice. *Pharmaceut Care. Res.* 156-159.
- Chuang, D.Y., Chan, M.H., Zong, Y., Sheng, W., He, Y., Jiang, J.H., et al. (2013). *Magnolia* Polyphenols Attenuate Oxidative and Inflammatory Responses in Neurons and Microglial Cells. *J Neuroinflammation.* 29; 10:15.
- Cieza, A., Anczewska, M., Ayuso-Mateos, J.L., Baker, M., Bickenbach, J., Chatterji, S., Hartley, S., Leonardi, M. (2015). Understanding the Impact of Brain Disorders: Towards a 'Horizontal Epidemiology' of Psychosocial Difficulties and Their Determinants. 10(9): e0136271.
- Cioni, C., Renzi, D., Calabro, A., Annunziata, P., Martin, F.C. (1998). Enhanced secretion of substance P by cytokine-stimulated rat brain endothelium cultures. *J Neuroimmunol.* 84:76–85. 21.
- Csicsvari, J., Jamieson, B., Wise, K.D., Buzsaki, G., (2003). Mechanisms of gamma oscillations in the Hippocampus of the behaving rat. *Neuron* 37, 311–322.
- Cock, E.H., Hesdorffer, D., Rossetti, A.O., Scheffer, I.E., Shinnar, S., Shorvon, S., Lowenstein, D.H. (2015). A definition and classification of status epilepticus-Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia.* 56(10):1515-23.

- D'Ambrosio. (2004). The role of glial membrane ion channels in seizures and epileptogenesis. *Pharmacol Ther.* 103(2):95-108.
- De Simoni, M.G., Perego, C., Ravizza, T., Moneta, D., Conti, M., Marchesi, F., De Luigi, A., Garattini, S., Vezzani, A. (2000). Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci.* 12(7):2623-33.
- Deshpande, L.S, Lou, J.K, Mian, A., Blair, R.E., Sombati, S., Attkisson, E., et al. (2008). Time course and mechanism of hippocampal neuronal death in an in vitro model of status epilepticus: role of NMDA receptor activation and NMDA dependent calcium entry. *Eur J Pharmacol.* 583(1):73-83.
- Deverman, B.E., & Patterson, P.H. (2009). Cytokines and CNS development. *Neuron.* 64(1), 61–78.
- Devin, J., Cross and Cavazos, J.E. (2007). Synaptic reorganization in subiculum and CA3 after early-life status epilepticus in the kainic acid rat model. *Epilepsy Res.* 73(2): 156–165.
- Devinsky, O., Schein, A., Najjar, S. (2013a). Epilepsy associated with systemic autoimmune disorders. *Epilepsy Curr.* 13(2):62-8.
- Devinsky, O., Vezzani, A., Najjar, S., De Lanerolle, N.C., Rogawski, M.A. (2013b) Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci.* 36(3):174-84.
- Dhir, A., Kulkarni, S.K. (2006). Rofecoxib, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor potentiates the anticonvulsant activity of tiagabine against pentylenetetrazol-induced convulsions in mice. *Inflammopharmacology.* 14(5-6):222-5.

- Dichter, M.A. (2009). Emerging concepts in the pathogenesis of epilepsy and epileptogenesis. *Arch Neurol.* 66(4):443-7.
- Dikalov, S., Losik, T. and Arbiser, J. L. (2003). Honokiol is a potent scavenger of superoxide and peroxy radicals. *Biochem. Pharmacol.* 76, 589-596
- Ding, L., Worrell, G.A., Lagerlund, T.D., He, B. (2007). Ictal source analysis: localization and imaging of causal interactions in humans. *Neuroimage.* (15);34(2):575-86.
- Diamond, J.S. (2005). Deriving the glutamate clearance time course from transporter currents in CA1 hippocampal astrocytes: transmitter uptake gets faster during development. *J Neurosci* 25;2906–2916.
- Doczi, J., Bernásková, K., Kubová, H., Détari, L., Világi, I., Druga R., Mares P. (2003). Long-term changes of activity of cortical neurons after status epilepticus induced at early developmental stages in rats. *Neurosci Lett.* 4;352(2):125-8.
- Dohgu, S., Takata, F., Yamauchi, A., Nakagawa, S., Egawa, T., Naito, M., Tsuruo, T., Sawada, Y., et al. (2005). Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. *Brain Res.* 1038(2):208-15.
- Doriat, J.F., Koziel, V., Humbert, A.C., Daval, J.L. (1999). Repeated seizure-associated long-lasting changes of N-methyl-D-aspartate receptor properties in the developing rat brain. *Int J Dev Neurosci.* 17(4):369-76.

- Doyle, L.W, Ehrenkranz, R.A, Halliday, H.L. (2010). Dexamethasone treatment after the first week of life for bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: a systematic review. *Neonatology*. 98:289-296.
- Dudek, F.E., Staley, K.J., Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W., Delgado-Escueta, A.V. (2010). The Time Course and Circuit Mechanisms of Acquired Epileptogenesis. SourceJasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
- Dube, C., Vezzani, A., Behrens, M., Bartfai, T., Baram, T.Z. (2005). Interleukin-1beta contributes to the generation of experimental febrile seizures. *Ann Neurol* 57:152–155.
- Dzhala, V.I., Talos, D.M., Sdrulla, D.A., Brumback, A.C., Mathews, G.C., Benke, T.A., Delpire, E., Jensen, F.E, Staley, K.J. (2005a). NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med*. 11(11):1205-13.
- Dziegielewska, K.M., Daikuhara, Y., Ohnishi, T., Waite, M.P., Ek, J., Habgood, M.D., Lane, M.A., et al. (2000b). Fetuin in the developing neocortex of the rat: distribution and origin. *J Comp Neurol*. 31;423(3):373-88.
- Dziegielewska, K.M., Møller, J.E., Potter, A.M., Ek, J., Lane, M.A., Saunders, N.R. (2000). Acute-phase cytokines IL-1beta and TNF-alpha in brain development. *Cell Tissue Res*. 299(3):335-45.
- Eid, T., Williamson, A., Lee, T.S, Petroff, O.A., de Lanerolle, N.C. (2008). Glutamate and astrocytes-key players in human mesial temporal lobe epilepsy? *Epilepsia*. 49; 2:42-52.

- Engel, J. Jr. (2001). Mesial Temporal Lobe Epilepsy: What Have We Learned? Review Neuroscientist. 7(4):340-52.
 - Fellin, T., Gomez-Gonzalo, M., Gobbo, S., Carmignoto, G., Haydon, P.G. (2006). Astrocytic glutamate is not necessary for the generation of epileptiform neuronal activity in hippocampal slices. J Neurosci. 6;26(36):9312-22.
 - Fisher, R.S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J.H., Elger, C.E., Engel, J. Jr, Forsgren, L., French, J.A. et al. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. Epilepsia. 55(4):475-82.
 - Folbergrová, J., Jesina, P., Haugvicová, R., Lisý, V., Houstek, J. (2010). Sustained deficiency of mitochondrial complex I activity during long periods of survival after seizures induced in immature rats by homocysteic acid. Neurochem Int. 56(3):394-403.
 - Forsgren, L., Beghi, E., Oun, A., Sillanpää, M. (2005). The epidemiology of epilepsy in Europe - a systematic review. Eur J Neurol. 12(4):245-53.
 - Fuchs, A., Baur, R., Schoeder, C., Sigel, E., Müller, C.E. (2014). Structural analogues of the natural products magnolol and honokiol as potent allosteric potentiators of GABA(A) receptors. Bioorg Med Chem. 15;22(24):6908-17.
 - Fujikawa, D.G., Shinmei, S.S., Cai, B. (2000). Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. Neuroscience. 98(1):41-53.
 - Fukuyama, Y., Nakade, K., Minoshima, Y. et al. (2002). Neurotrophic activity of honokiol on the cultures of fetal rat cortical neurons. Bioorg Med Chem Lett. 12:1163–
- 6.6

- Furukawa, K., Mattson, M.P. (1998). The transcription factor NF-kappaB mediates increases in calcium currents and decreases in NMDA- and AMPA/kainate-induced currents induced by tumor necrosis factor-alpha in hippocampal neurons. *J Neurochem.* 70: 1876–1886. 25.
- Gadiant, R.A., & Otten U. (1994a). Expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat brain during postnatal development. *Brain Research.* 637(1–2), 10–4.
- Gadiant, R.A., & Otten, U. (1994b). Identification of interleukin-6 (IL-6)-expressing neurons in the cerebellum and hippocampus of normal adult rats. *Neuroscience Letters.* 182(2), 243–6.
- Galanopoulou, A. S. (2008b). GABA(A) receptors in normal development and seizures: friends or foes? *Current Neuropharmacology.* 6; 1:1–20.
- Galanopoulou, A. S., Coppola, A., et al. (2010). The functional and structural impact of epileptic seizures on the developing brain. *Atlas of Epilepsies.* Panayiotopoulos, C. P., London, Springer-Verlag 1:321–8.
- Galic, M.A., et al. (2008). Postnatal inflammation increases seizure susceptibility in adult rats. *J Neurosci.* 28: 6904–6913.
- Garay, P.A., & McAllister, A.K. (2010). Novel roles for immune molecules in neural development: Implications for neurodevelopmental disorders. *Frontiers in Synaptic Neuroscience.* 2:124-136.
- Garcia-Curran, M.M., Hall, A.M., Patterson, K.P., Shao, M., Eltom, N., Chen, K., Dubé, C.M., Baram, T.Z. Dexamethasone Attenuates Hyperexcitability Provoked by

Experimental Febrile Status Epilepticus. *eNeuro*. 2019;15;6(6). Greer PL, Greenberg, M.E. (2008). From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron*. 59:846–860.

- Giulian, D., Tapscott, M.J. (1988). Immunoregulation of cells within the central nervous system. *Brain Behav Immun*. 2(4):352-8.
- Giaume, Ch. (2010). Astroglial Wiring Is Adding Complexity to Neuroglial Networking. *Front Neuroenergetics*. 20; 2:129.
- Grzybicki, D., Dobbs, M., Ihyer, S., Clotfelter, J., Macvilay, S., et al. (2002). Interleukin 6 promotes vasculogenesis of murine brain microvessel endothelial cells. *Cytokine*. 12(6), 655–65.
- Gualtieri, F., Nowakowska, M., von Rüden, E.L., Seiffert, I., Potschka, H. (2019). Epileptogenesis-Associated Alterations of Heat Shock Protein 70 in a Rat Post-Status Epilepticus Model. *Neuroscience* (1); 415:44-58.
- Gobbo, O.L., O'Mara, S.M. (2004b). Post-treatment, but not pre-treatment, with the selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib markedly enhances functional recovery from kainic acid-induced neurodegeneration. *Neuroscience*. 125(2):317-27.
- Goldberg, E.M., Coulter, D.A. (2013). Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nat Rev Neurosci*. 14(5):337-49.
- Golan, H., Levav, T., Mendelsohn, A., Huleihel, M. (2004). Involvement of Tumor Necrosis Factor Alpha in Hippocampal Development and Function. *Cereb Cortex*. 14(1):97-105.

- Gong, C., Shi, S., Wang, X., Wang, Y., Fu, S., Dong, P., et al. (2009). Novel composite drug delivery system for honokiol delivery: self-assembled poly (ethylene glycol)-poly(epsilon-caprolactone)-poly (ethylene glycol) micelles in thermosensitive poly (ethylene glycol)-poly(epsilon-caprolactone)-poly (ethylene glycol) hydrogel. *J Phys Chem B*. 113(30):10183–810.
- Haas, K.Z., Sperber, E.F., Moshé, S.L. (1992). Kindling in developing animals: interactions between ipsilateral foci. *Brain Res Dev Brain Res*. 24;68(1):140-3.
- Haas, KZ, Ellen, F. Sperber, Lisa A., Opanashuk, P.K. (2001). Stanton and Solomon L. Moshe Resistance of Immature Hippocampus to Morphologic and Physiologic Alterations Following Status Epilepticus or Kindling. *Hippocampus*. 11:615–625.
- Haglid, K.G., Wang, S., Qiner, Y., Hamberger, A. (1994). Excitotoxicity. Experimental correlates to human epilepsy. *Mol Neurobiol*. 9(1-3):259-63.
- Harada, S., Kishimoto, M., Kobayashi, M., Nakamoto, K., Fujita-Hamabe, W., Chen, H.H., et al. (2012). Honokiol suppresses the development of postischemic glucose intolerance and neuronal damage in mice. *J Nat Med*. 66(4):591–9.
- Hattori, M., Endo, Y., Takebe, S., Kobashi, K., Fukasaku, N., Namba, T. (1986) Metabolism of magnolol from *Magnoliae* cortex. II. Absorption, metabolism and excretion of [ring-14C] magnolol in rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 34(1):158-67.
- Hauser, W.A., Annegers, J.F., Kurland, L.T. (1993). Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935–1984. *Epilepsia*. 34:453–468.
- Hayden, M.S, Ghosh., S. (2004). Signaling to NF-KappaB. *Genes Dev*. 18:2195-2224.

- Heida, J.G., Boissé L., Pittman, Q.J. Lipopolysaccharide-induced febrile convulsions in the rat: short-term sequelae. *Epilepsia*. 2004;45(11):1317-29.
- Heida, J.G., Pittman, Q.J. (2005). Causal links between brain cytokines and experimental febrile convulsions in the rat. *Epilepsia*. 46: 1906-13.
- Hellier, J.L., and Dudek, F.E. (2005). Chemoconvulsant model of chronic spontaneous seizures. In *Current Protocols in Neuroscience: Models of Chronic Spontaneous Seizures* Ed. Crawley, J. Hoboken: Wiley & Sons. Chapter 9; 9-19.
- Herlenius, E., Lagercrantz, H. (2004). Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental Neurology*. 8-21.
- Herdegen, T, Leah, J.D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CreB/ATF proteins. *Brain Res. Brain. Res. Rev.* 28:370–490.
- Hirsch, E., Danober, L., Simler, S., Pereira de Vasconcelos, A., Maton, B., Nehlig, A., Marescaux, C., Vergnes, M. (1997). The amygdala is critical for seizure propagation from brainstem to forebrain. *Neuroscience*. 77(4):975-84.
- Hoi, C.P., Ho, Y.P., Baum, L., Chow, A.H. (2010). Neuroprotective effect of honokiol and magnolol, compounds from *Magnolia officinalis*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *Phytother Res*. 24(10):1538-42.
- Holmes, G.L., Thompson, J.L., Huh, K., Holmes, C., Carl, G.F. (1991a). Effect of neural transplants on seizure frequency and kindling in immature rats following kainic acid. *Brain Res Dev Brain Res*. (17);64(1-2):47-56.

- Holmes, G.L. (1991b). The long-term effects of seizures on the developing brain: clinical and laboratory issues. *Brain Dev. Review.* 13(6):393-409.
- Holtman, L.E.A., van Vliet, R., van Schaik, C.M. Aronica Q.E., Gorter, J.A. (2009). Effects of SC58236, a Selective COX-2 Inhibitor, on Epileptogenesis and Spontaneous Seizures in a Rat Model for Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy Res.* 84(1):56-66.
- Hopkins, S.J., Rothwell, N.J. (1995). Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci.* 18(2):83-8.
- Hu, S., et al. (2000). Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. *Neuroimmunomodulation.* 7: 153-159.
- Iori, V., Iyer, A.M., Ravizza, T., Beltrame, L., Paracchini, L., Marchini, S., et al. (2017). Blockade of the IL-1R1/TLR4 pathway mediates disease-modification therapeutic effects in a model of acquired epilepsy. *Neurobiol Dis.* 99:12-23.
- Irie, T., Miyamoto, E., Kitagawa, K. et al. (2001). An anxiolytic agent, dihydrohonokiol-B, inhibits ammonia-induced increases in the intracellular Cl⁻ of cultured rat hippocampal neurons via GABA(c) receptors. *Neurosci Lett.* 312:121-33.
- Ivens, S., Kaufer, D., Flores, L.P., Bechmann, I., Zumsteg, D., Tomkins, O., Seiffert, E., Heinemann, U., Friedman, A. (2007). TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain.* 130;(2):535-47.
- Jabs, R., Paterson, I.A., Walz, W. (1997). Qualitative analysis of membrane currents in glial cells from normal and gliotic tissue in situ: down-regulation of Na⁺ current and lack of P2 purinergic responses. *Neuroscience.* 81(3):847-60.

- Järvelä, J.T., Ruohonen, S., Kukko-Lukjanov T.K., Plysjuk A., Lopez-Picon, FR., Holopainen, I.E. (2011). Kainic Acid-Induced Neurodegeneration and Activation of Inflammatory Processes in Organotypic Hippocampal Slice Cultures: Treatment With cyclooxygenase-2 Inhibitor Does Not Prevent Neuronal Death. *Neuropharmacology*.60(7-8):1116-25.
- Jensen, E.F. (2009). Neonatal Seizures: An Update on Mechanisms and Management. *Clin Perinatol*. 36 (4):881.
- Jensen, M.S., Azouz, R., Yaari, Y. (1994). Variant firing patterns in rat hippocampal pyramidal cells modulated by extracellular potassium. *J Neurophysiol*. 71(3):831-9.
- Jiang, M.Z., Tsukahara, H., Ohshima, Y., Todoroki, Y., Hiraoka, M., Maeda, M., Mayumi, M. (2004). Effects of antioxidants and nitric oxide on TNF-alpha-induced adhesion molecule expression and NF-kappaB activation in human dermal microvascular endothelial cells. *Life Sci*. (23);75(10):1159-70.
- Joseph, E.K., Levine, J.D. (2006). Mitochondrial electron transport in models of neuropathic and inflammatory pain. *Pain*. 121(1-2):105-14.
- Kadam, S.D., White, A.M, Staley, K.J, Dudek, F.E. (2010). Continuous electroencephalographic monitoring with radio-telemetry in a rat model of perinatal hypoxia–ischemia reveals progressive post-stroke epilepsy. *J Neurosci*. 30: 404–415.
- Kaufmann, W.E., Worley, P.F, Pegg, J., Bremer, M., Isakson, P. (1996). COX-2, a Synaptically Induced Enzyme, Is Expressed by Excitatory Neurons at Postsynaptic Sites in Rat Cerebral Cortex. *Proc Natl Acad Sci*. 19;93(6):2317-21. Kawaguchi, K., Hickey, R.W., Rose, M.E., Zhu, L., Chen, J., Graham, S.H. (2005). Cyclooxygenase-2

expression is induced in rat brain after kainate-induced seizures and promotes neuronal death in CA3 hippocampus. *Brain Res.* 19;1050(1-2):130-7.

- Klein, P., Dingledine, R., Aronica, E., Bernard, C., Blümcke, I., Boison, D., Brodie, M.J., Brooks-Kayal, A.R., Engel J. Jr., et al. (2018). Commonalities in epileptogenic processes from different acute brain insults: Do they translate? *Epilepsia.* 59(1):37-66.
- Kotani, A., Kojima, S., Hakamata, H., Jin, D., Kusu, F. (2005). Determination of honokiol and magnolol by micro HPLC with electrochemical detection and its application to the distribution analysis in branches and leaves of *Magnolia obovata*. *Chem Pharm Bull.* 53(3):319-22.
- Kotsopoulos, I.A., van Merode, T., Kessels, F.G., de Krom, M.C., Knottnerus, J.A. (2002). Systematic review and meta-analysis of incidence studies of epilepsy and unprovoked seizures. *Epilepsia.* 43(11):1402–1409.
- Kubota, T., Kushikata, T., Fang, J., & Krueger, J. M. (2002). Nuclear factor-kappaB inhibitor peptide inhibits spontaneous and interleukin-1beta-induced sleep. *American Journal of Physiology —Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 279(2), 404–13.
- Kubová, H., Druga, R., Lukasiuk, K., Suchomelová, L., Haugvicová, R., Jirmanová, I., Pitkänen, A. (2001). Status epilepticus causes necrotic damage in the mediodorsal nucleus of the thalamus in immature rats. *J Neurosci.* (15);21(10):3593-9.
- Kubová, H., Lukasiuk, K., Pitkänen, A. (2012). New insight on the mechanisms of epileptogenesis in the developing brain. *Adv Tech Stand Neurosurg.* 39:3-44.

- Kubová, H., Druga, R., Haugvicová, R., Suchomelová, L., Pitkanen, A. (2002). Dynamic changes of status epilepticus-induced neuronal degeneration in the mediodorsal nucleus of the thalamus during postnatal development of the rat. *Epilepsia*. 43; 5:54-60.
- Kubová, H., Mareš, P. (2007). Hypoxia-induced changes of seizure susceptibility in immature rats are modified by vigabatrin. *Epileptic Disord*. 9(1): S36-43.
- Kubová, H., Mareš, P. (2013). Are morphologic and functional consequences of status epilepticus in infant rats progressive? *Neuroscience*. (3); 235:232-49.
- Kudin, A., Tatiana, A., Jan, K., Seyfried, S.V., Beck, H., Elger, Ch.E, Kunz, WS. (2002). Seizure-dependent Modulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Rat Hippocampus. *Eur J Neurosci*. 15(7):1105-14.
- Kunz, T., Oliw, E.H. (2001a). Nimesulide aggravates kainic acid-induced seizures in the rat. *Pharmacol Toxicol*. 88(5):271-6.
- Kunz, T., Oliw, E.H. (2001b). The selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib reduces kainate-induced cell death in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 13(3):569-75.
- Kuo, D.H., Lai, Y.S., Lo, C.Y., Cheng, A.C., Wu, H., Pan, M.H. (2010). Inhibitory effect of magnolol on TPA-induced inflammation and tumor promotion in mice. *J Agric Food Chem*. 12;58(9):5777-83.
- Kurz, J.E., et al. (2001). A significant increase in both basal and maximal calcineurin activity in the rat pilocarpine model of status epilepticus. *J. Neurochem*. 78:304–315.

- Ku, T.H., Lee, Y.J., Wang, S.J., Fan, C.H., Tien, L.T. (2011). Effect of honokiol on activity of GAD65 and GAD67 in the cortex and hippocampus of mice. *Phytomedicine*. 15;18(13):1126-9.
- Lado, F.A., Laureta, E.C., Moshe, S.L. (2002). Seizure-induced hippocampal damage in the mature and immature brain. *Epileptic Disord*. 4(2):83-97.
- Lai, Ch.S., Lai, Y.S., Kuo, H.K., Wu, Ch.H., Ho, Ch.T., Pan, M.H. (2011). Magnolol potently suppressed lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression via downregulation MAPK and NF- κ B signaling pathways. *Journal of functional foods*. 198-206.
- Laurén, H.B., Ruohonen, S., Kukko-Lukjanov, T.K., Virta, J.E., Grönman, M., Lopez-Picon, F.R., Järvelä, J.T., Holopainen, I.E. (2013). Status epilepticus alters neurogenesis and decreases the number of GABAergic neurons in the septal dentate gyrus of 9-day-old rats at the early phase of epileptogenesis. *Brain Res*. 21; 1516:33-44.
- Lee, D.H., Szczepanski, M.J., Lee, Y.J. (2009). Magnolol induces apoptosis via inhibiting the EGFR/PI3K/Akt signaling pathway in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem*. 15;106(6):1113-22.
- Lee, J., Jung, E., Park, J., Jung, K., Lee, S., Hong, S., et al. (2005). Anti-inflammatory effects of magnolol and honokiol are mediated through inhibition of the downstream pathway of MEKK-1 in NF- κ B activation signaling. *Planta Medica*. 71, 4, 338-343.
- Lee, J.W., Lee, Y.K., Lee, B.J., Nam, S.Y., Lee, S.I., Kim, Y.H., et al. (2009). Inhibitory effect of ethanol extract of *Magnolia officinalis* and 4-O-methylhonokiol on memory

impairment and neuronal toxicity induced by beta-amyloid. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010;95(1):31-40.

- Lee, M.C., Ting, K.K, Adams, S., Brew, B.J., Chung, R., Guillemin, G.J. (2010). Characterization of the expression of NMDA receptors in human astrocytes. *Plos One* 5: e14123.
- Lee, Y.J., Choi, D.Y., Yun, Y. P., Han, S.B., Kim, H.M., et al. (2013). Ethanol extract of *Magnolia officinalis* prevents lipopolysaccharide-induced memory deficiency via its antineuroinflammatory and antiamyloidogenic effects. *Phytother. Res.* 27, 438–447.
- Lee, Y.J., Lee, Y.M., Lee, C.K., Jung, J.K., Han, S.B., Hong, J.T. (2011). Therapeutic applications of compounds in the *Magnolia* family. *Pharmacol Ther.* 2011;130(2):157-76.
- Li, Ch.Y., Chao, K., Wang, S., Chang, Ch., Tsai, Z.H, et al. (2011). Honokiol inhibits LPS-Induced maturation and inflammatory response of human monocyte derived dendritic cells. *J. Cell Physiol.* 226,2338-2349.
- Li, H., Kraus, A., Wu, J., Huguenard, J.R., Fisher, R.S. (2006). Selective changes in thalamic and cortical GABAA receptor subunits in a model of acquired absence epilepsy in the rat. *Neuropharmacology.* 51(1):121-8.
- Li, N., Song, Y., Zhang, W., Wang, W., Chen, J., Wong, A.W., Roberts, A. (2007). Evaluation of the in vitro and in vivo genotoxicity of magnolia bark extract. *Regul Toxicol Pharmacol.* 49(3):154-9.

- Lin, S.P., Tsai, S.Y., Lee, Chao P.D., Chen, Y.C., Hou, Y.C. (2011). Pharmacokinetics, bioavailability, and tissue distribution of magnolol following single and repeated dosing of magnolol to rats. *Planta Med.* 77(16):1800-5.
- Lin, Y.R., Chen, H.H., Ko, CH., Chan, M.H. (2005). Differential inhibitory effects of honokiol and magnolol on excitatory amino acid evoked cation signals and NMDA induced seizures. *Neuropharmacology.* 49 (4): 542–50.
- Lin, Y.R., Chen, H.H., Ko, CH., Chan, M.H. (2006). Neuroprotective activity of honokiol and magnolol in cerebellar granule cell damage. *Eur J Pharmacol.* 537(1-3):64-9.
- Lin, Y.R., Chen, H.H., Lin, Y.C., Ko, C.H., Chan, M.H. (2009). Antinociceptive actions of honokiol and magnolol on glutamatergic and inflammatory pain. *J Biomed Sci.* (16); 16:94.
- Liou, K.T., Lin, S.M., Huang, S.S. et al. (2003a). Honokiol ameliorates cerebral infarction from ischemia-reperfusion injury in rats. *Planta Med.* 69:130 – 4.
- Liou, K.T., Shen, Y.C., Chen, C.F. et al. (2003b). Honokiol protects rat brain from focal cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting neutrophil infiltration and reactive oxygen species production. *Brain Res.* 992:159–66.2.
- Liu, B., Hattori, N., Zhang, N.Y. et al. (2005). Anxiolytic agent, dihydrohonokiol-B, recovers amyloid beta protein-induced neurotoxicity in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 384:44.

- Liu, Z., Zhang, X., Cui, W., Zhang, X., Li, N., Chen, J., Wong, A.W., Roberts A. (2007). Evaluation of short-term and subchronic toxicity of magnolia bark extract in rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 49(3):160-71.
- Liu, J., Tang, M., Lai, H., Dong, Y., Xie, C., Ye, H., Ma, L., Qiu, N., et al. (2013). Identification of metabolites of honokiol in rat urine using ¹³C stable isotope labeling and liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 21; 1295: 48-56.
- Löscher, W., Brandt, C. (2010). Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol Rev.* 62(4):668-700.
- Löscher, W., Hirsch, L.J., Schmidt, D. (2015). The Enigma of the Latent Period in the Development of Symptomatic Acquired Epilepsy - Traditional View Versus New Concepts. *Review Epilepsy Behav.* 52:78-92.
- Loturco, J.J., Owens, D.F., Heath, M.J., Davis, M.B., Kriegstein, A.R. (1995). GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron.* 15:1287–1298.
- Lothman, E.W., Bertram, E.H., Stringer, JL. (1991). Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog Neurobiol. Review.* 37(1):1-82.
- Lorigados, L., Orozco, S., Morales, L., Estupiñán, B., García, I., Rocha, L. (2013). Excitotoxicidad y muerte neuronal en la epilepsia. *Biotecnología Aplicada.* 30:1-8.
- Lowenstein, D.H. (1999). Status epilepticus: an overview of the clinical problem. *Epilepsia.*40; (1): S3-8; discussion S21-2.

- Lukasiuk, K., Dabrowski, M., Adach, A., Pitkanen, A. (2006). Epileptogenesis related genes revisited. *Prog Brain Res.* 158: 223-41.
- Maloney, E.M., Chaila, E., O'Reilly, É.J., Costello, D.J. (2019). Application of Recent International Epidemiological Guidelines to a Prospective Study of the Incidence of First Seizures, Newly-Diagnosed Epilepsy and Seizure Mimics in a Defined Geographic Region in Ireland. *Neuroepidemiology.* 53(3-4):225-236.
- Marcheselli, V.L., Bazan, N.G. (1996). Sustained induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by seizures in hippocampus. Inhibition by a platelet-activating factor antagonist. *J Biol Chem.* (4);271(40):24794-9.
- Marin, I., Kipnis, J. (2013). Learning and memory ... and the immune system. *Learn Mem.* (19);20(10):601-6. doi: 10.1101/lm.028357.112.
- Maroso, M., Balosso, S., Ravizza, T., Liu, J., Bianchi, M.E., Vezzani A. (2011). Interleukin-1 type 1 receptor/Toll-like receptor signalling in epilepsy: the importance of IL-1beta and high-mobility group box 1. *J Intern Med.* 270(4):319-26.
- Mareš, P., Kubová H. (2016). Does Status Epilepticus Induced at Early Postnatal Period Change Excitability After Cortical Epileptic Afterdischarges? *Epilepsia.* 57(8): e183-6.
- Martínez, A.L, Domínguez, F., Orozco-Suarez, S., Chavez, M., Salgado, H., Gonzales, M., et al. (2006). Neuropharmacological effects of an ethanol extract of the Magnolia de albata Zucc leaves in mice. *Journal of Ethnopharmacology.* 106:250-255.
- Matsuda, H., Kageura, T., Oda, M., Morikawa, T., Sakamoto, Y. and Yoshikawa, M. (2001). Effects of constituents from the bark of Magnolia obovata on nitric oxide

production in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Chem. Pharm. Bull.* 49, 716-720. 13.

- McElroy, W.T. (2019). Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) inhibitors: an updated patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2019; 29(4):243-259. doi: 10.1080/13543776.2019.1597850.
- Morales-Sosa M., Orozco-Suárez S., Vega-García A., Caballero-Chacón S., Feria-Romero I. (2018). Immunomodulatory effect of Celecoxib on HMGB1/TLR4 pathway in a recurrent seizures model in immature rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 170:79-86.
- Moreira, J.D., Siqueira L., Lague, V.M., Porciúncula, L.O, Vinadé, L., Souza, D. (2011). Short-term alterations in hippocampal glutamate transport system caused by one-single neonatal seizure episode: Implications on behavioral performance in adulthood. *Neurochem Int.* 59: 217–223.
- Moshé, S.L., Albala, B.J., Ackermann, R.F., Engel, J. Jr. (1983a). Increased seizure susceptibility of the immature brain. *Brain Res.* 1983;283(1):81-5.
- Moshé, S.L., Albala, B.J. (1983b). Maturation changes in postictal refractoriness and seizure susceptibility in developing rats. *Ann Neurol.* 13(5):552-7.
- Moshé, S.L., Shinnar, S., Swann, J.W. (1995). Partial (focal) seizures in developing brain. *Brain Development and Epilepsy.* New York: Oxford University Press. 34–65.
- Moshé, S.L., Sperber, E.F., Brown, L.L., Tempel, A. (1992). Age-dependent changes in substantia nigra GABA-mediated seizure suppression. *Epilepsy Res.* 8:97-106.

- Munroe, M.E., Arbiser, J.L., Bishop, G.A. (2007). Honokiol, a Natural Plant Product, Inhibits Inflammatory Signals and Alleviates Inflammatory Arthritis. *J Immunol.* 15;179(2):753-63.
- Murakami, Y., Kawata, A., Seki, Y., Koh, T., Yuhara, K., Maruyama, T., et al. (2012). Comparative inhibitory effects of magnolol, honokiol, eugenol and bis-eugenol on cyclooxygenase-2 expression and nuclear factor-kappa B activation in RAW264.7 macrophage-like cells stimulated with fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*. *In vivo.* 26(6):941–50.
- Murchison, D., Griffith, W.H. (2000). Mitochondria buffer non-toxic calcium loads and release calcium through the mitochondrial permeability transition pore and sodium/calcium exchanger in rat basal forebrain neurons. *Brain Res.* 854(1-2):139-51.
- Nadler, J.V. (1979). Kainic acid: neurophysiological and neurotoxic actions. *Life Sci.* 24(4):289-99.
- Nachtergaeel, A., Poivre, M., Belayew, A., Duez, P. (2015). In vitro genotoxicity tests point to an unexpected and harmful effect of a *Magnolia* and *Aristolochia* association. *J Ethnopharmacol.* 4; 174:178-86.
- Nairismägi, J., Pitkänen, A., Kettunen, M.I., Kauppinen, R.A., Kubova, H. (2006). Status epilepticus in 12-day-old rats leads to temporal lobe neurodegeneration and volume reduction: a histologic and MRI study. *Epilepsia.* 47(3):479-88.
- Neligan, A., Shorvon, S.D. (2011). Prognostic factors, morbidity and mortality in tonic-clonic status epilepticus: a review. *Epilepsy Res.* 93(1):1-10.

- Nehlig, A., Pereira de Vasconcelos, A. (1996). The Model of Pentylentetrazol-Induced Status Epilepticus in the Immature Rat: Short- And Long-Term Effects. *Epilepsy Res.* 26(1):93-103.
- Nissinen, J., Lukasiuk, K., Pitkänen, A. (2001). Is mossy fiber sprouting present at the time of the first spontaneous seizures in rat experimental temporal lobe epilepsy? *Hippocampus.* 11(3):299-310.
- Nitecka, L., Tremblay, E., Charton, G., Bouillot, J.P., Berger, M.L., Ben-Ari, Y. (1984). Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. II. Histopathological sequelae. *Neuroscience.* 13(4):1073-94.
- Noe, F.M., Polascheck, N., Frigerio, F., Bankstahl, M., Ravizza, T., Marchini, S., Beltrame, L., et al. (2013). Pharmacological Blockade of IL-1 β /IL-1 Receptor Type 1 Axis During Epileptogenesis Provides Neuroprotection in Two Rat Models of Temporal Lobe Epilepsy. *Neurobiol Dis.* 59:183-93.
- Okada, R., Moshé, S.L., Albala, B.J. (1984). Infantile status epilepticus and future seizure susceptibility in the rat. *Brain Res.* 317(2):177-83.
- Orozco-Suarez, S., Gonzales Ramírez, M., Castillo Medina, S. (2007). Effect of neonatal seizures on brain development in: *Neuroscience Research.* Bios-Medica. Publishing Inc. Guadalajara, México. 4:146-156.
- Orozco-Suarez, S., Feria-Romero, I., Rayo D. et al. (2012). Adaptative immune response in epilepsy. In: Jagat R, editor. *Recent advances in immunology to target cancer, inflammation and infections.* Croatia: Intech open science open midns. 2012: 135-58.

- Paxinos, G., Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic press. UK.
- Pape, H.C. (1996). Review Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol*. 58:299-327.
- Parent, J.M. (2002). The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair. *Epilepsy Res*. 50(1-2):179-89.
- Patel, M., Li, QY. (2003). Age dependence of seizure-induced oxidative stress. *Neuroscience*. 118(2):431-7.
- Patra, A., Huang, H., Bauer, J.A, Giannone, P.J. (2017). Neurological consequences of systemic inflammation in the premature neonate. *Neural Regen Res*. 12(6):890-896.
- Peinado, A., Yuste, R., Katz, L.C. (1993). Extensive dye coupling between rat neocortical neurons during the critical period of circuit formation. *Neuron*. 1993; 10:103–114.
- Penkowa, M., Molinero, A., Carrasco, J., Hidalgo, J. (2001). Interleukin-6 deficiency reduces the brain inflammatory response and increases oxidative stress and neurodegeneration after kainic acid-induced seizures. *Neuroscience*. 102:805–818.
- Pereira de Vasconcelos, A., Vergnes, M., Boyet, S., Marescaux, C., Nehlig, A. (1997). Forebrain metabolic activation induced by the repetition of audiogenic seizures in Wistar rats. *Brain Res*. 762(1-2):114-20.
- Pitkänen, A., Lukasiuk, K., Dudek, F.E., Staley, K.J. (2015). *Epileptogenesis*. Cold Spring Harb Perspect Med. 18;5(10).

- Pitkänen, A., Roivainen, R., Lukasiuk, K. (2016). Development of epilepsy after ischaemic stroke. *Lancet Neurol.* 15(2):185-197.
- Pitkänen, A., Engel, J.Jr. (2014). Review Past and present definitions of epileptogenesis and its biomarkers. *Neurotherapeutics.* 11(2):231-41.
- Planas, A.M., Soriano, M.A., Estrada, A., Sanz, O., Martin, F., Ferrer, I. (1997). The heat shock stress response after brain lesions: induction of 72 kDa heat shock protein (cell types involved, axonal transport, transcriptional regulation) and protein synthesis inhibition. *Prog Neurobiol.* 51(6):607-36.
- Plotkin, M.D., Kaplan, M.R., Peterson, L.N., Gullans, S.R., Hebert, S.C., Delpire, E. (1997). Expression of the Na (+)-K (+)-2Cl⁻ cotransporter BSC2 in the nervous system. *Am J Physiol.* 272(1):173-83.
- Polascheck, N., Bankstahl, M., Löscher, W. (2010). The COX-2 inhibitor parecoxib is neuroprotective but not antiepileptogenic in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol.* 224:219–233.
- Pozas, E., Ballabriga, J., Planas, A.M., Ferrer, I. (1997). Kainic acid-induced excitotoxicity is associated with a complex c-Fos and c-Jun response which does not preclude either cell death or survival. *J Neurobiol.* 33(3):232-46.
- Qu, Y., Vadivelu, S., Choi, L., Liu, S., Lu, A., Lewis, B., Girgis, R., Lee, C.S., et al. (2003). Neurons derived from embryonic stem (ES) cells resemble normal neurons in their vulnerability to excitotoxic death. *Exp Neurol.* 184(1):326-36.

- Qiang, L.Q., Wang, C.P., Wang, F.M., Pan, Y., Yi, L.T., Zhang, X., Kon, L.D. (2009). Combined Administration of the Mixture of Honokiol and Magnolol and Ginger Oil Evokes Antidepressant-Like Synergism in Rats. *Arch Pharm Res.* 32(9):1281-92.
- Racine, R.J., Gartner, J.G., Burnham, W.M. (1972). Epileptiform activity and neural plasticity in limbic structures. *Brain Res.* 27;47(1):262-8.
- Racine, R.J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 32(3):269-79.
- Racine, R.J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 32(3):281-94.
- Racine, R., Okujava, V., Chipashvili, S. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. 3. Mechanisms. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 32(3):295-9.
- Rakhade, S.N., et al. (2008). Early alterations of AMPA receptors mediate synaptic potentiation induced by neonatal seizures. *J. Neurosci.* 28:7979–7990.
- Rakhade, S.N. and Jensen, F.E. (2009). Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms. *Nat Rev Neurol.* 5(7):380.
- Raol, Y.H., Lapedes, D.A., Keating, J.G., Brooks-Kayal, A.R., Cooper, E.C. (2009). A KCNQ channel opener for experimental neonatal seizures and status epilepticus. *Ann Neurol.* 65(3):326-36.
- Ravizza, T., Balosso, S., Vezzani, A. (2011). Inflammation and prevention of epileptogenesis. *Neurosci Lett.* 27;497(3):223-30.

- Ravizza, T., Gagliardi, B., Noé, F., Boer, K., Aronica, E., Vezzani, A. (2008a). Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* 29(1):142-60.
- Ravizza, T., Noé, F., Zardoni, D., Vaghi, V., Sifringer, M., Vezzani, A. (2008). Interleukin Converting Enzyme inhibition impairs kindling epileptogenesis in rats by blocking astrocytic IL-1beta production. *Neurobiol Dis.* 31(3):327-33.
- Ravizza, T., Rizzi, M., Perego, C., Richichi, C., Veliskova, J., Moshe, S.L., De Simoni, M.G., Vezzani, A. (2005). Inflammatory response and glia activation in developing rat hippocampus after status epilepticus. *Epilepsia.* (46); 5:113–117.
- Ravizza, T., Vezzani, A. (2006). Status epilepticus induces time-dependent neuronal and astrocytic expression of interleukin-1 receptor type I in the rat limbic system. *Neuroscience.* 137(1):301-8.
- Restrepo, C., Márquez, E., Sanz, M. “Plasmaféresis terapéutica, tipos, técnica e indicaciones en medicina interna”. 2009. Recuperado de <http://actamedicacolombiana.com/anexo/articulos/v34n1a5.pdf>
- Riazi, K., Galic, M.A., Pittman, Q.J. (2010). Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: cytokines and brain excitability. *Epilepsy Res.* 89(1):34-42.
- Rice, A.C., De Lorenzo, R.J. (1998). NMDA receptor activation during status epilepticus is required for the development of epilepsy. *Brain Res.* 782(1-2): 240-7.
- Rivera, C., Voipio, J., Kaila, K. (2005). Two developmental switches in GABAergic signalling: The K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CA VII. *J Physiol.* 562:27–36.

- Rizzi, M., C. Perego, M. Aliprandi, C. Richichi, T. Ravizza, D. Colella, J. Veliskova, S.L. Moshe, M.G. De Simoni, A. Vezzani. (2003). Glia activation and cytokine increase in rat hippocampus by kainic acid-induced status epilepticus during postnatal development. *Neurobiol. Dis.* 14(3):494–503.
- Romjin, H., Hofman, M., Gramsberg, A. (1991). At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn baby? *Early Human dev.* 26; 61-67.
- Rothwell, N.J., Hopkins, S.J. (1995). Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci.* 18(3):130-6.
- Rojas, A., Chen, D., Ganesh, T., Varvel, N.H., Dingledine, R. (2019). The COX-2/prostanoid Signaling Cascades in Seizure Disorders. *Review Expert Opin Ther Targets.* 23(1):1-13.
- Rosillo-de la Torre, A., Zurita-Olvera, L., Orozco-Suárez, A., García Casillas, P.E., SalgadoCeballos, H., Luna-Bárceñas, G., Rocha, L. (2015). Phenytoin carried by silica core iron oxide nanoparticles reduces the expression of pharmacoresistant seizures in rats. *Nanomedicine.* 10 (24), 3563–3577
- Rubio, C., Rubio-Osornio, M., Retana-Márquez, S., Verónica Custodio, M.L., Paz, C. (2010). In vivo experimental models of epilepsy. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 10(4):298-309.
- Sanchez, R.M., Jensen, F.E. (2001). Maturation aspects of epilepsy mechanisms and consequences for the immature brain. *Epilepsia.* 42(5):577-85.

- Sanchez, R.M., Koh, S., Rio, C., Wang, C., Lamperti, E.D., Sharma, D., Corfas, G., Jensen, F.E. (2001). Decreased glutamate receptor 2 expression and enhanced epileptogenesis in immature rat hippocampus after perinatal hypoxia-induced seizures. *J Neurosci* 21:8154–8163.
- Sankar, R., Auvin, S., Mazarati, A., Shin, D. (2007a). Inflammation Contributes to Seizure-Induced Hippocampal Injury in the Neonatal Rat Brain. *Acta Neurol Scand.*186:16-20.
- Sankar, R., Rho, J.M. (2007b). Do Seizures Affect the Developing Brain? Lessons from the Laboratory. *Review J Child Neurol.* 5:21-9
- Sankar, R., Shin, D., Liu, H., Katsumori, H., Wasterlain, C.G. (2000). Granule cell neurogenesis after status epilepticus in the immature rat brain. *Epilepsia.*41(6):53-56.
- Santana-Gómez, C.E., Valle-Dorado, M.G., Domínguez-Valentín, A.E., Hernández-Moreno, A., Orozco-Suárez, S., Rocha, L. (2018). Neuroprotective effects of levetiracetam, both alone and combined with propylparaben, in the long-term consequences induced by lithium-pilocarpine status epilepticus. *Neurochem Int.* 120, 224–232
- Santos, N.F., Arida, R.M., Filho, E.M., Priel, M.R., Cavalheiro, E.A. (2000a). Epileptogenesis in immature rats following recurrent status epilepticus. *Brain Res Rev.* 32(1):269-76.
- Santos, N.F., Marques, R.H., Correia, L., Sinigaglia-Coimbra, R., Calderazzo, L., Sanabria, E.R., Cavalheiro, E.A. (2000b). Multiple Pilocarpine-Induced Status

Epilepticus in Developing Rats: A Long-Term Behavioral and Electrophysiological Study. *Epilepsia*. 6:57-63.

- Saunders, N.R., Dziegielewska, K.M., Møllgård, K., Habgood, M.D. (2018). Physiology and molecular biology of barrier mechanisms in the fetal and neonatal brain. *J Physiol*. 596(23):5723-5756.
- Sarkisian, M.R., Tandon, P., Liu, Z., Yang, Y., Hori, A., Holmes, G.L., Stafstrom, C.E. (1997). Multiple kainic acid seizures in the immature and adult brain: ictal manifestations and long-term effects on learning and memory. *Epilepsia*. 38(11):1157-66.
- Stafstrom, C.E., Chronopoulos, A., Thurber, S., Thompson, J.L., Holmes, G.L., (1993). Age dependent cognitive and behavioral deficits after kainic acid seizures. *Epilepsia*. 34(3), 420–432.
- Stafstrom, C.E., Holmes, G.L. (2002). Effects of uncontrolled seizures. Neural changes in animal models. *Adv Exp Med Biol*. 497:171-94.
- Stafstrom, C.E., Carmant, L. (2015). Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1;5(6): a022426.
- Schreiber, S.S., Najm, I., Tocco, G., Baudry, M. (1993). Co-expression of HSP72 and c-fos in rat brain following kainic acid treatment. *Neuroreport*. 13;5(3):269-72.
- Schlichtiger, J., Pekcec, A., Bartmann, H., Winter, P., Fuest, C., Soerensen, J., Potschka H., (2010). Celecoxib treatment restores pharmacosensitivity in a rat model of pharmaco-resistant epilepsy. *Br. J. Pharmacol*. 160 (5), 1062–1071.

- Seo, J.H., Lee, Y.J., Lee, K.H., Gireesh, E., Skinner, H., Westerveld, M. (2019). Autoimmune Encephalitis and Epilepsy: Evolving Definition and Clinical Spectrum. *Korean J Pediatr.* 1-10.
- Sarrica, A., Kirika N., Romeo, M., Salmona, M., Diomedede, L. (2018). Safety and Toxicology of Magnolol and Honokiol. *Review Planta Med.* 84(16):1151-1164.
- Shapira, Y., Yadid, G., Cotev, S., Niska, A., Shohami, E. (1990). Protective effect of MK801 in experimental brain injury. *J Neurotrauma.* 7(3):131-9.
- Shen, C., Ni, C L., Shen, Y. C., Huang, Y.L., Kuo, C. et al. (2007). Phenolic constituents from the stem bark of *Magnolia officinalis*. *J. Nat. Prod.* 2; 168-171.
- Silverstein, F.E., Gerald, F., Goldstein J.L., Lee S. (2000). Pincus Theodore., Whelton Andrew. et al. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study». *Journal of the American Medical Association.* 284 (10): 1247-1255.
- Simmons, D.L., Botting, R.M., Hla, T. (2004). Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Review Pharmacol Rev.* 56(3):387-437.
- Sillanpää, M., Cross, J.H. (2009). The Psychosocial Impact of Epilepsy in Childhood. *Epilepsy Behav.* 1: S5-10.
- Slevin, H.J., Gibbs, J.E., Cock, H.R. (2006). The antioxidant N-acetyl-L-cysteine does not prevent hippocampal glutathione loss or mitochondrial dysfunction associated with status epilepticus. *Epilepsy Res.* 69(2):165-9.

- Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.D, et al. (2007). The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell*. 14;131(6):1164-78.
- Sominsky, L., De Luca, S., & Spencer, S. J. (2018). Microglia: Key players in neurodevelopment and neuronal plasticity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 94, 56–60.
- Son, H. J., Lee, H. J., Yun-Choi, H. S. and Ryu J. H. (2000). Inhibitors of nitric oxide synthesis and TNF-alpha expression from *Magnolia obovata* in activated macrophages. *Planta. Med.* 66, 469-471.
- Suchomelova, L., Lopez-Meraz, M.L., Niquet, J., Kubova, H., Wasterlain, C.G. (2015). Hyperthermia Aggravates Status Epilepticus-Induced Epileptogenesis and Neuronal Loss in Immature Rats. *Neuroscience*. 1:305:209-24.
- Sperber, E.F., Stanton, P.K., Haas K., Ackermann, R.F., Moshé, S.L. (1992). Developmental differences in the neurobiology of epileptic brain damage. *Epilepsy Res.* 9:67-80.
- Sperk, G. (1994). Kainic acid seizures in the rat. *Prog Neurobiol.* 42(1):1-32.
- Stafstrom, C.E., Holmes, G.L. (2002a). Effects of uncontrolled seizures. Neural changes in animal models. *Adv Exp Med Biol.* 497:171-94.
- Stafstrom, C.E. (2002b). Assessing the behavioral and cognitive effects of seizures on the developing brain. *Prog Brain Res.* 135:377-90.

- Stellwagen, D., Beattie, E.C., Seo, J.Y., Malenka, R.C. (2005). Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci.*25: 3219–3228.
- Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J.C, et al. (2002). Control of synaptic strength by glial TNF alpha. *Science* 2002; 295:2282–2285. 26.
- Stevens, B., Allen, N. J., Vazquez, L. E., Howell, G. R., Christopherson, K. S., Nouri, N., et al. (2007). The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell.* 2007; 131(6), 1164–78.
- Swann, J.W., Brady, R.J., Martin, D.L. (1989). Postnatal development of GABA-mediated synaptic inhibition in rat hippocampus. *Neuroscience.* 28:551–561.
- Szelényi, J. (2001). Cytokines and the central nervous system. *Brain Res Bull.* (1);54(4):329-38.
- Szczurowska, E., Mareš, P. (2013). NMDA and AMPA receptors: development and status epilepticus. *Physiol Res.* (62);1: 21-38.
- Skowrońska, K., Obara-Michlewska, M., Zielińska M., Albrecht, J. (2019). NMDA Receptors in Astrocytes: In Search for Roles in Neurotransmission and Astrocytic Homeostasis. *Review Int J Mol Sci.* 14;20(2):309.
- Talarek, S., Listos, J., Barreca, D. et al. (2017). Neuroprotective effects of honokiol: from chemistry to medicine. *Biofactors.* 43(6): 760-9.
- Temp, F.R., Marafija, J.R., Milanesi, L.H., Duarte, T., Rambo, L.M., Pillat, M.M., Mello, C.F. (2017). Cyclooxygenase-2 Inhibitors Differentially Attenuate Pentylentetrazol-Induced Seizures and Increase of Pro- And Anti-Inflammatory

Cytokine Levels in the Cerebral Cortex and Hippocampus of Mice. *Eur J Pharmacol.* 5; 810:15-25.

- Terrone, G., Pauletti, A., Pascente, R., Vezzani, A. (2016). Preventing epileptogenesis: A realistic goal? *Pharmacol Res.* 110:96-100.
- Tremblay, E., Nitecka, L., Berger, M.L., Ben-Ari, Y. (1984). Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. I. Clinical, electrographic and metabolic observations. *Neuroscience.* 13(4):1051-72.
- Tretter, L., Sipos, I., Vizi A.V. (2004). Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 29(3):569-77.
- Tse, A.K., Chi-Keung, W., Gou Yuan, Z., Xiao Ling S., Hon Yeung Ch., Mengsu Yang, Fong, W.F. (2005). Honokiol inhibits TNF- α stimulated NF κ B activation and NF κ B regulated gene expression through suppression of IKK activation. *Biochemical Pharmacology.* 1443-1457.
- Tse, A.K, Wan, C.K, Zhu, G.Y., Shen, X.L., Cheung, H.Y., Yang, M., Fong, W.F. (2007). Magnolol suppresses NF-kappaB activation and NF-kappaB regulated gene expression through inhibition of IkappaB kinase activation. *Mol Immunol.* 44(10):2647-58.
- Toscano, Ch.D., Philip, J.K., Lawrence, J.M., Bosetti, F. (2008). NMDA-induced Seizure Intensity Is Enhanced in COX-2 Deficient Mice. *Neurotoxicology.* 29(6):1114-20.

- Trinka, E., Cock, H., Hesdorffer, D., Rossetti, A.O., Scheffer, I.E., et al. (2015). A Definition and Classification of Status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Review Epilepsia*. 56(10):1515-23.
- Tsai, T.H., Chou, C.J., Chen, C.F. (1996). Pharmacokinetics and brain distribution of magnolol in the rat after intravenous bolus injection. *J Pharm Pharmacol*. 48(1):57-9.
- Turrin, N.P., Plata-Salamán, C.R. (2000). Cytokine-cytokine interactions and the brain. *Brain Res Bull*. 1;51(1):3-9.
- Tyzio, R., Represa, A., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., Gozlan, H., Anikszajn, L. (1999). The establishment of GABAergic and Glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. *J Neurosci*. 19(23):10372-10382
- Ullal, G., Fahnestock, M., Racine, R. (2005). Time-dependent effect of kainite induced seizures on glutamate receptor GluR5, GluR6, and GluR7 mRNA and Protein Expression in rat hippocampus. *Epilepsia*. 46(5):616-23.
- Valentim, L.M., Geyer, A.B., Tavares, A., Cimarosti, H., Worm, P.V., Rodnight, R., et al. (2001). Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein 27 immuncontent and phosphorylation in rat hippocampus. *Neuroscience*. 107(1):43-9.
- Valdés-Cruz, A., Negrete Diaz, J.V., Magdaleno-Madrigal, V.M., Martinez Vargas, D., Fernandez-Mas, R., Almazan-Alvaro, S. (2012). Electroencephalographic activity in neonatal ventral hippocampus lesion in adult's rats. *Synapse* 66, 738–746.

- Vega-García, A., Santana-Gómez, C.E., Rocha, L., Magdaleno-Madrigal, V.M., Morales-Otal, A., Buzoianu-Anguiano, V., Feria-Romero, I., Orozco-Suárez, S. (2019). *Magnolia officinalis* reduces the long-term effects of the status epilepticus induced by kainic acid in immature rats. *Brain Res Bull.* 149:156-167.
- Velisek, L., Moshe, L.S. (2008). *Pathophysiology of Seizures and Epilepsy in the Immature Brain: Cells, Synapses, and Circuits. Pediatric Epilepsy “Diagnosis and Therapy”*. Tercera edición. Demos medicals publishing, New York. 3-25.
- Velísek, L., Velísková, J., Moshé, S.L. (1985). Developmental seizure models. *Ital J NeurolSci.* 16(1-2) :127-33.
- Vezzani, A., Balosso, S., Ravizza, T. (2008). The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Epilepsy. *Review Brain Behav Immun.* 22(6):797-803.
- Vezzani, A., French, J., Bartfai, T., Baram, T.Z. (2011). The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol* 7: 31-40.
- Vezzani, A., Auvin, S., Ravizza, T., Aronica, E., Noebels, J.E., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W., Delgado-Escueta, A.V. (2012). Glia-neuronal Interactions in Ictogenesis and Epileptogenesis: Role of Inflammatory Mediators. Review. In: *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). 1-26.
- Vezzani, A., Friedman A., Dingledine R.J. The role of inflammation in epileptogenesis. *Neuropharmacology.* 2013; 69:16-24.
- Vezzani, A., Viviani, B. (2015). Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology.* 96:70-82.

- Vezzani, A., Balosso, S., Ravizza T. 2019. Neuroinflammatory Pathways as Treatment Targets and Biomarkers in Epilepsy. Review Nat Rev Neurol. 15(8):459-472
- Vincent, P., Mulle, C. (2009). Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. Neuroscience. 158(1):309-23.
- Vitkovic, L., Konsman, J.P., Bockaert, J., Dantzer, R., Homburger, V., & Jacque, C. (2000). Cytokine signals propagate through the brain. Molecular Psychiatry. 5(6), 604–15.
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., et al. (2003). Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. J Neurosci. 23:8692–8700. 24.
- Volpe, J.J. (2008). Neonatal encephalitis and white matter injury: more than just inflammation? Ann Neurol. 64(3):232-6.
- Wang, S., Cheng, Q., Malik, S., Yang, J. (2000). Interleukin-1beta inhibits gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor current in cultured hippocampal neurons. J Pharmacol Exp Ther. 292:497–504.
- Wang, X.H., Cai, L.L., Zhang, X.Y., Deng, L.Y., Zheng, H., Deng, C.Y., et al. (2011). Improved solubility and pharmacokinetics of PEGylated liposomal honokiol and human plasma protein binding ability of honokiol. Int J Pharm. 2011; 410(1–2):169–7410.
- Wasterlain, C.G., Niquet, J., Thompson, K.W., Baldwin, R., Liu, H., Sankar, R., Mazarati, A.M., Naylor, D., Katsumori, H., Suchomelova, L., Shirasaka, Y. (2002). Seizure-induced neuronal death in the immature brain. Prog Brain Res. 135:335-53. Review.

- Watanabe, K., Watanabe, H., Goto, Y., Yamaguchi, M., Yamamoto, N., Hagino, K. (1983). Pharmacological properties of magnolol and honokiol extracted from *Magnolia officinalis*: central depressant effects. *Planta Med.* 49(10):103–8.
- West, M.J. (1993). New Stereological Methods for Counting Neurons. *Neurobiology of Aging.* 275-285.
- Wei, F., Yan L.M., Su, T., He, N., Lin, Z.J., Wang, J. et al. 2017. Ion Channel Genes and Epilepsy: Functional Alteration, Pathogenic Potential, and Mechanism of Epilepsy. *Review Neurosci Bull.* 33(4):455-477.
- Wilson-Costello, D., Walsh, M.C., Langer, J.C., Guillet, R., Lupton, A.R., Stoll, B.J., Shankaran, S., Finer, N.N. et al. (2009). National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network Impact of postnatal corticosteroid use on neurodevelopment at 18 to 22 months' adjusted age: effects of dose, timing, and risk of bronchopulmonary dysplasia in extremely low birth weight infants. *Pediatrics.* 123: e430-437
- Wolfe, K.B., Snyder, C.C., Gisslen, T., Kemp, M.W., Newnham, J.P., Kramer, B.W., Jobe, A.H., Kallapur, S. (2013). Modulation of lipopolysaccharide-induced chorioamnionitis in fetal sheep by maternal betamethasone. *Reprod Sci.* 20:1447-1454.
- Yang, Y., Liu, Z., Cermak, J.M., Tandon, P., Sarkisian, M.R., Stafstrom, C.E., Neill, J.C., Blusztajn, J.K., Holmes, G.L. (2000). Protective effects of prenatal choline supplementation on seizure-induced memory impairment. *J Neurosci.* 15;20(22):RC109.

- Yu, Y., Li, M., Su, N., Zhang, Z., Zhao, H., et al. (2016). Honokiol protects against renal ischemia/reperfusion injury via the suppression of oxidative stress, iNOS, inflammation and STAT3 in rats. *Mol. med. Rep.* 13, 1353– 1360.
- Chen, Y.H., Kuo, T.T., Chu, M.T., Ma, H.I., Chiang, Y.H., Yi-Kung Huang, E. (2013). Postnatal Systemic Inflammation Exacerbates Impairment of Hippocampal Synaptic Plasticity in an Animal Seizure Model. *Neuroimmunomodulation.* 20:223–232.
- Zayachkivsky, M. J. Lehmkuhle, J. H. Fisher, J. J. Ekstrand, and F. E. Dudek. (2013). Recording EEG in immature rats with a novel miniature telemetry system. *J Neurophysiol.* 109: 900–911.
- Zhai, H., Nakade, K., Oda, M., et al. (2005). Honokiol-induced neurite out growth promotion depends on activation of extra cellular signal-regulated kinases (ERK1/2). *Eur J Pharmacol.* 516:112–7.
- Zhang, B., Maniatis, T., Song, Y., Zhang, W., Zhang, X., Li, N., Chen, J., Wong, A.W., Roberts, A. (2008). Evaluation of magnolia bark extract in chromosomal aberration assays. *Mutat Res.* 31;654(2):133-7.
- Zhang, K., Tolstykh, G.P., Sanchez, R.M., Cavazos, J.E. (2011). Chronic Cellular Hyperexcitability in Elderly Epileptic Rats with Spontaneous Seizures Induced by Kainic Acid Status Epilepticus while Young Adults. *Aging Dis.* 2(4):332-8.
- Zhang, P., Liu, X., Zhu, Y., Chen, S., Zhou, D., Wang, Y. (2013). Honokiol inhibits the inflammatory reaction during cerebral ischemia reperfusion by suppressing NF-kappaB activation and cytokine production of glial cells. *Neurosci Lett.* 534:123–7.

- Zheng, X., Wang, X., Gou, M., Zhang, J., Men, K., Chen, L., et al. (2010). A novel transdermal honokiol formulation based on Pluronic F127 copolymer. *Drug Deliv.* 17(3).
- Zhou, H.Y., Myoung Shin, E.M. Guo, L.Y., Youn, U.J., Bae, K.H, et al. (2008). Anti-inflammatory Activity of 4-methoxyhonokiol Is a Function of the Inhibition of iNOS and COX-2 Expression in RAW 264.7 Macrophages via NF-kappaB, JNK and p38 MAPK Inactivation. *Eur J Pharmacol.* 586(1-3):340-9.

14. ARTÍCULO CIENTIFICO.

Brain Research Bulletin 149 (2019) 156–167



Contents lists available at ScienceDirect

Brain Research Bulletin

journal homepage: www.elsevier.com/locate/brainresbull



Research report

Magnolia officinalis reduces the long-term effects of the status epilepticus induced by kainic acid in immature rats

A. Vega-García^{a,b}, C.E. Santana-Gómez^c, L. Rocha^c, V.M. Magdaleno-Madrigal^d, A. Morales-Otal^e, V. Buzoianu-Anguiano^b, I. Feria-Romero^b, S. Orozco-Suárez^{b,*}

^a Programa de Doctorado del Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-I, Universidad Autónoma Metropolitana Campus Iztapalapa, Ciudad de México, Mexico

^b Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, "Dr. Bernardo Sepúlveda", Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS, Ciudad de México, Mexico

^c Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Tlalpan, Ciudad de México, Mexico

^d División de Investigación en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñis", Ciudad de México, Mexico

^e Área de Neurociencias. Departamento de Neurohistología y Conducta. Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, Mexico



ARTICLE INFO

Keywords:

Magnolia officinalis
Honokiol
Magnolol
Early seizures
Neuroprotection
Kainic acid
Epileptogenesis

ABSTRACT

During critical periods of neurodevelopment, the immature brain is susceptible to neuronal hyperexcitability, alterations such as hyperthermia, hypoxia, brain trauma or a preexisting neuroinflammatory condition can trigger, promote and prolong epileptiform activity and facilitate the development of epilepsy. The goal of the present study was to evaluate the long-term neuroprotective effects *Magnolia officinalis* extract, on a model of recurrent status epilepticus (SE) in immature rats. Sprague-Dawley rats were treated with kainic acid (KA) (3 mg/kg, dissolved in saline solution) beginning at day 10 P N every 24 h for five days (10 P N–14 P N). Two experimental groups (KA) received two treatments for 10 days (14–24 P N): one group was treated with 300 mg/kg *Magnolia Officinalis* (MO) (KA-MO), and another was treated with 20 mg/kg of celecoxib (Clbx) (KA-Clbx) as a control drug. A SHAM control group at day 90 P N was established. Seizure susceptibility was analyzed through an after-discharge threshold (ADT) evaluation, and electroencephalographic activity was recorded. The results obtained from the ADT evaluation and the analysis of the electroencephalographic activity under basal conditions showed that the MO and Clbx treatments protected against epileptiform activity, and decreases long-term excitability. All rats in the KA-MO and KA-Clbx groups presented a phase I seizure on the Racine scale, corresponding to the shaking of a wet dog. In contrast, the KA group showed phase V convulsive activity on the Racine scale. Similarly, MO and Clbx exerted neuroprotective effects on hippocampal neurons and reduced gliosis in the same areas. Based on these results, early intervention with MO and Clbx treatments to prevent the inflammatory activity derived from SE in early phases of neurodevelopment exerts neuroprotective effects on epileptogenesis in adult stages.

1. Introduction

Epilepsy is one of the most common neurological disorders worldwide and is characterized by spontaneous and recurrent seizure activity [Jensen and Baram, 2000; Blumenfeld et al., 2003]. During critical periods of neurodevelopment, the immature brain is susceptible to neuronal hyperexcitability [Ben-Ari and Holmes, 2006; Sating et al., 2006] because neuronal excitability promotes synaptogenesis and the reorganization of neural circuits essential for specific functions in

adulthood. Therefore, hyperthermia, hypoxia, brain trauma or a pre-existing neuroinflammatory condition [Sayin et al., 2006; Dube et al., 2005; Sankar et al., 2007; Ravizza et al., 2005,2006,2008; Suchomelova et al., 2015] can trigger, promote and prolong epileptiform activity, as well as facilitate the establishment of status epilepticus (SE), which is defined as a continuous and irreversible condition of seizure activity greater than 30 min without recovery of consciousness between the seizures. Approximately 40% of people with some type of epilepsy in adulthood are estimated to have an SE registry at some early stage of

* Corresponding author at: Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, 06720, Ciudad de México, Mexico.
E-mail addresses: sorozco5@hotmail.com, sandra.orozcoss@imss.gob.mx (S. Orozco-Suárez).

<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.04.003>

Received 25 March 2019; Accepted 5 April 2019

Available online 09 April 2019

0361-9230/ © 2019 Published by Elsevier Inc.

childhood [Kubová and Mareš, 2007; Orozco-Suarez et al., 2007; Löscher and Brandt, 2010].

Clinical and experimental evidence has reported a close link between the etiopathogenesis of epilepsy and the neuroinflammatory response. Thus, the activation of proinflammatory signaling pathways such as IL-1R/TLR and the subsequent expression of COX-2, TGF- β , HMGB-1 and TNF- α participate in the processes of "epileptogenesis" or the "period of silence" [Ravizza and Vezzani, 2006, 2018; Laurén et al., 2013; Suchomelova et al., 2015]. These terms refer to the period between acute damage due to an SE of unknown etiology and the presentation of the first spontaneous seizure or in the absence of apparent stimulation, as well as the progression of an established case of epilepsy, which places neuroinflammation as a key factor contributing to epileptogenesis and neuronal hyperexcitability [Dichter, 2009].

The use of anti-inflammatory and immunosuppressive treatments has been reported to reduce the damage produced by seizure activity. However, these treatments do not exert antiepileptogenic effects, and their use in early stages of life produces various side effects [Pitkänen and Sutula, 2002; Polaschek et al., 2010]. Thus, traditionally used medicinal plants, such as *Magnolia officinalis* (MO), are the focus of study. The therapeutic utility of these plants is attributed to the components honokiol and magnolol. These components have been tested in experimental models of Alzheimer's disease and cerebral ischemia and exerted neuroprotective effects linked to their antioxidant and anti-inflammatory activities that regulate COX-2 and prostaglandin expression and reactive oxygen species (ROS) production, and reduce excitotoxicity induced by glutamate and N-methyl-D-aspartate (NMDA) [Kuribara et al., 1996; Pernot et al., 2011; Irie et al., 2001; Lee et al., 2005, 2011; Liou et al., 2007; Li et al., 2011]. Therefore, the goal of the present study was to evaluate the long-term neuroprotective effects of *Magnolia officinalis* on a model of recurrent status epilepticus in immature rats

2. Materials and methods

2.1. Chemical and reagents

Kainic acid (K-0250), polyethylene glycol (P3015), sodium carboxymethylcellulose (419273), paraformaldehyde (P6148), Harris' hematoxylin (HHS16) were obtained from Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, USA), *Magnolia officinalis* extract was acquired through vegetable capsules with 30 mg as food supplement, standardized 90% honokiol and magnolol by HPLC analysis, from Smart, City, SA (Luxembourg), Celecoxib from Parafarm-laboratory, Mexico, Diva de cloaker 10X buffer and DAB Chromogen kit (DB801 L) from Biocare Medical (CA, USA), bovine normal serum and mouse IgG-peroxidase secondary antibody (PI-200) were achieved from Vector Laboratories (Temecula CA, USA), NeuN (MAB-3077) antibody and Entellan synthetic resin were acquired from Merck-Millipore (USA), GFAP antibody from Agilent-Dako (Santa Clara, CA, USA), Ketamine hydrochloride (Anesket; Q-7833-028) and xylazine (Procin; Q-7833-099) were acquired from Agricultural Pisa laboratories (Guadalajara City, México)

2.2. Animals

Postnatal day 10 immature rats (PN) of the Sprague-Dawley strain with an initial weight of 20–25 grams were used in the present study. Fifteen adult female rats were accustomed to handling by the researcher before gestation, as well as during the lactation period, to minimize the negative effects of stress on maternal behaviors and separation. The animals were housed in individual cages at a regulated temperature of ~ 23 °C, maintained on a light/dark cycle of 12 h, and provided water and food *ad libitum*. The offspring were separated from the mother on day 21 PN and housed under the same conditions until the end of the experiment. All procedures, including the use, management and care of animals, adhered to the guidelines of and were approved by the Ethics

and Research Committee of the Hospital of Specialties in the National Medical Center Century XXI, Mexican Social Security Institute (IMSS) and Mexican Official Standard [1999]; NOM-062-ZOO, 1999.

2.3. Repeated status epilepticus (SE) paradigm

Beginning on day 10 PN, rats displaying a weight of no less than 25 gr or greater than 30 gr began to be treated with 3 mg/kg of kainic acid (KA, dissolved in saline solution) intraperitoneally via (i.p.) injections every 24 h for five days (10–14 PN). Pups were separated from the mother for 90 min and maintained at a temperature of approximately 35 °C using a heating pad. During this period, the evolution of motor behavior was observed to determine whether the rats presented convulsive activity and SE subsequent to the administration of KA. Continuous scratching movements of the lower extremities were observed, with a loss of posture and myoclonus of the head; the animals maintained this behavior without modification for more than 5 min. From that moment, the presence of SE was established, which was maintained for 30 additional minutes [Ben-Ari et al., 1984; 1985; Albala et al., 1984; Stafstrom et al., 1993]. The motor behavior of KA-treated animals was simultaneously compared with an equal number of animals treated with a saline solution via i.p. injections that were maintained under the same conditions and time of maternal separation [Stafstrom et al., 1993; Zhang et al., 2011; Kun et al., 2011; Zayachkivsky et al., 2013]. At the end of the evaluation, a single dose of 3 mg/kg of diazepam was intramuscularly (i.m.) injected to constrain the severity of the convulsive activity. Rats in the SHAM group received an i.m. injection of a saline solution and the same time of maternal separation was maintained. The rat pups were again placed with the mother, and she regrouped, stimulated and nourished them. This same treatment was repeated for five days (10–14 PN) [(Fig.1) [Dudek et al., 2002; Hellier and Dudek, 2005; Kun et al., 2011; 2013].

2.4. *Magnolia officinalis* and Clbx post-SE treatments

After the last treatment with KA (two hours later), two control groups were formed: a SHAM group and the KA group. Both groups were treated with a saline solution via oral gavage with an appropriate volume in relation to weight. Two experimental groups were also established (both of which were previously submitted to the KA-repeated SE model). A solution of MO capsules was diluted with 20% polyethylene glycol; the concentration of honokiol and magnolol was checked by HPLC, the rats (n = 10) was treated with 300 mg/kg *Magnolia officinalis* (MO) via oral gavage (KA + MO). Other group was treated with 20 mg/kg celecoxib via oral gavage (KA + Clbx), diluted in 0.5% sodium carboxymethylcellulose. The treatment was repeated every 24 h for 10 days (14–24 PN) [Martinez et al., 2006; Suchomelova et al., 2015].

2.5. Determination of the after-discharge threshold (ADT)

The experiment described below was designed to determine the susceptibility of the different control and experimental groups to epilepsy at day 90 PN (adult stage). For this purpose, a bipolar electrode was implanted in the right ventral hippocampus at day 80 PN. Rats were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg, im) and xylazine (20 mg/kg, im). The implant was placed at the following coordinates from the Bregma located in the surface of the skull using stereotaxic surgery: anteroposterior -5.3; lateral -5.2; and depth -7.5 [Paxinos and Watson, 1998]. The electrode was then fastened with a stainless-steel surgical screw placed in the frontal bone, and three additional screws were placed on the skull in reference to the frontal and occipital cortex to stabilize the implant, which was later fixed with dental acrylic. Rats were allowed a 7-day postoperative recovery period [Rosillo-de la Torre et al., 2015; Santana-Gómez et al., 2017].

ADT is defined as the minimum intensity necessary to generate a

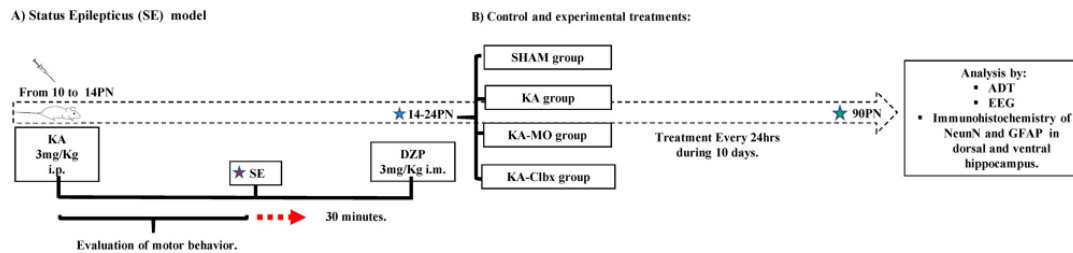


Fig. 1. Image showing the schematic representation of the experimental protocol used to determine the long-term effects of *Magnolia officinalis* on early life Status epilepticus A) The recurrent SE model induced by 3 mg/kg i.p. of KA (kainic acid) from day 10 PN. In the evaluation of motor behavior, continuous scratching movements of the lower extremities were observed, with a loss of posture and myoclonus of head. Maintenance of this behavior without modification for greater than 5 min, from that moment, established the presence of SE was established, which was maintained for 30 more minutes before 3 mg/kg DZP (Diazepam) was i.m., administered. The treatment was repeated every 24 h for 5 days. B) Control groups: SHAM and KA received saline by oral gavage (volume in relation to weight). Experimental groups: the KA + MO group received 300 mg/kg *Magnolia officinalis* (MO) diluted in 20% polyethylene glycol via oral gavage and the KA + Clbx group was treated with 20 mg/kg celecoxib (KA + Clbx) diluted in 0.5% sodium carboxymethylcellulose via oral gavage. Each control and experimental group included $n = 10$ animals. The treatment was repeated every 24 h for 10 days (14–24 P N).

postdischarge with a duration of 3 s. This tool allows us to determine the level of excitability of the hippocampus under different conditions. A series of electrical rectangular stimuli were applied at 60 Hz with a duration of 1 ms in 1-minute intervals. The initial intensity was 10 μ A and was increasing by 20% between each stimulus until a behavioral change (ipsilateral to the implant site) or a change in electroencephalographic activity was observed. The motor behavior evoked by the ADT was evaluated using the modified Racine scale [Racine, 1972; Luttjohann et al., 2009]. The duration of ADT and electroencephalographic activity was recorded with the GRASS program Poly VIEW, Astro-Med. Inc [Cramer et al., 1998].

2.6. Evaluation of electroencephalographic (EEG) activity at 90 PN age

The electroencephalographic activity was evaluated under baseline conditions and after the determination of the ADT using a model P511 amplifier (Grass Technologies, West Warwick, RI). The signal was amplified with a 0.1–100 Hz bandpass filter by digitizing 1000samples/s. The baseline data and data obtained 2 min after ADT were analyzed. One minute of each period was analyzed using the fast Fourier transform (FFT), and the power values corresponding to the different bands were normalized to the maximum power value of each analyzed band (0.1–4 Hz delta, 4–8 Hz theta, 8–13 Hz alpha, 13–30 Hz beta and 30–90 Hz gamma) as a percentage of total power (mean of all power estimates) in a frequency window. These power estimates are known as normalized percent power. Power spectra were normalized separately for each subject, experimental condition and electrode. The electroencephalographic activity was analyzed using the software developed in the Neurosciences Research Department of the "Ramón de la Fuente Muñis" Psychiatric Institute, Mexico [Fernandez-Mas et al., 1998; Valdes-Cruz et al., 2012; Santana-Gómez et al., 2018].

2.7. NeuN - immunohistochemistry

At the end of the experiment (day 90 P N), rats were transcardially perfused with a saline solution (9%) followed by 4% paraformaldehyde. The encephalon was obtained by performing a craniotomy and it was stored in fixation buffer for 72 h at 4 °C. Afterwards, the tissue was processed, embedded in paraffin, and sectioned coronally at a thickness of 6 μ m at the level of the dorsal and ventral hippocampus using a microtome (Leica RM2125RT, Germany).

For the analysis of neural preservation based on NeuN expression, sections were dewaxed and hydrated with a decreasing gradient of alcohol solutions, followed by the recovery of antigens with Diva de-cloaker using a pressure cooker for 20 min. Sections were washed with 0.12 M PBS-T (phosphate buffer plus Triton detergent), pH 7.2–7.6, and

endogenous peroxidases were inhibited with 0.5% hydrogen peroxide (H_2O_2) for 10 min, nonspecific antigens were blocked with normal bovine serum (1:200 in PBS) for 30 min. Next, the tissue was incubated with a 1:500 dilution of an anti-NeuN antibody in PBS for 24 h at 4 °C, washed twice, and incubated with the anti-mouse IgG-peroxidase secondary antibody (1:200) in 0.12 M PBS for 3 h. Two washes with 0.12 M PBS were performed to remove the excess secondary antibody, and the staining was developed with a DAB Chromogen kit for 5 min and carefully washed with distilled water for 5 min. Sections were again dehydrated and mounted with Entellan synthetic resin (Merck Millipore).

2.8. Counting and analysis of the number of NeuN-immunoreactive neurons in the dorsal and ventral hippocampus

Two researches that were blinded to the count the cells in each section. Slices were observed under a light microscope (Nikon Eclipse E600) equipped with a cooling chamber (Evolution MP cooler 5.0 RTV) and analyzed using Image-Pro Plus 7 software (Media Cybernetics). The average cell density per unit of volume was determined in the dentate gyrus (DG), CA1 and CA3 in the dorsal and ventral hippocampus using the optical fractionator counting method and reviewed by Schmitz and Hof [West, 1993; Schmitz and Hofc, 2005] with a 40x air objective (Plan/40 \times 0.65). For the determination of the total number (N) of NeuN-positive cells in each animal, three of the four fractionators quantities were necessary to calculate the total object number in each structure: area sampling frequency (asf; 1/XY area between dissectors), thickness sampling frequency (tsf; disector depth/section thickness), and total number of objects counted in all dissectors (ΣQ). The remaining value, section-sampling frequency (ssf), is simply the number of regularly spaced sections used for counts divided by the total number of sections through the structure of interest. These values were calculated offline to estimate total number of objects (N) in the counted region using the formula:

$$N = (Q-) \times 1/ssf \times 1/asf \times 1/tsf$$

In this formula, Q- represents the number of cells in a known volume fraction of each area evaluated.

2.9. Qualitative analysis of GFAP (Glial fibrillary acidic protein) expression of the dorsal and ventral hippocampus

Gliosis was examined using same procedure described for NeuN with a 1:500 dilution of an anti-GFAP antibody for 24 h at 4 °C and an anti-rabbit IgG-peroxidase (1:500) secondary for 3 h. Staining was revealed with 3,3-diaminobenzidine (Biocare Medical, Concord, CA,

USA). The tissue was stained with Harris' hematoxylin, and the sections were dehydrated and mounted with Entellan synthetic resin.

2.10. Statistical analysis

All data from each group are presented as means \pm standard errors (mean \pm SEM). ADT and NeuN immunohistochemistry values were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc multiple comparison test. Percent changes were used to correlate the values for different levels of response to ADT and the motor behaviors observed. The power spectrum values were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc multiple comparison test. A significance criterion of $p < 0.05$ was proposed.

3. Results

3.1. ADT and behavioral assessments using a modification of the 1972 Racine scale

Lower ADT values were observed for the KA, KA-MO and KA-Clbx groups than the SHAM group, $p < 0.0025$, $p < 0.0001$ and $p < 0.0049$, respectively, a 56% change was observed between the SHAM and KA groups, 74.7% between the SHAM and KA-MO groups and 49.59% between the SHAM and KA-Clbx groups. Compared to the KA group, the KA-Clbx and KA-MO groups did not show significant differences. However, they exhibited 42.4% and 49.9% changes, respectively. The KA-Clbx and KA-MO groups did not show significant differences; however, they exhibited 12.9% changes (Fig. 2A).

Regarding the motor behavior, it was observed during ADT evaluation, that 100% of rats in each group exhibited changes in motor behavior during the ADT assessment using the modified Racine scale [Racine et al., 1972; Luttjohann et al., 2009] Phase I, ipsilateral winking and wet dog shakes; Phase II, chewing, facial and head movements; Phase III, clonus of forelimbs; Phase IV, kangaroo position; and Phase V, loss of posture and limb clonus. Seventy percent of the animals in the KA group presented Phase V seizures, corresponding to clonic-tonic-type seizure activity, and 30% presented Phase III seizures compared to the SHAM, KA-MO and KA-Clbx groups, where 100% of the rats presented Phase I seizures (Fig. 2B).

3.2. Assessment of electroencephalographic activity

Basal period. The electroencephalographic activity obtained from recordings under baseline conditions showed homogenous electroencephalographic activity in SHAM and KA groups compared to the KA-MO and KA-Clbx groups, which showed a prevalence of low frequency oscillations at 4–8 and 13–30 Hz. However, these activities were significantly lower, $\alpha p < 0.0001$ and $\beta p < 0.0001$, than the SHAM and KA groups, respectively (Fig. 3 A–C).

Postperiod ADT. Following the determination of ADT, the SHAM group showed homogeneous electroencephalographic activity in all bands similar to baseline conditions, with a significant difference of $\alpha p < 0.0001$ compared to the KA, KA-MO and KA-Clbx groups. The KA-MO and KA-Clbx groups showed a decrease in activity at frequencies of 8–13 and 30–90 Hz groups, and the KA group showed decreased activity at a frequency of 30–90 Hz in after the ADT determination. The KA group predominantly showed activity in the frequency bands of 8–13 Hz, $\beta p < 0.0001$, compared to the KA-MO and KA-Clbx groups, which showed similar activity to the KA group (Fig. 4A–C).

3.3. Preserved neurons

Following the quantification of preserved neurons displaying NeuN immunoreactivity in the dorsal hippocampus, the SHAM control group showed a significant preserved neurons number ($p < 0.0001$) in the CA1 region compared with the KA and KA-MO groups, as well as the

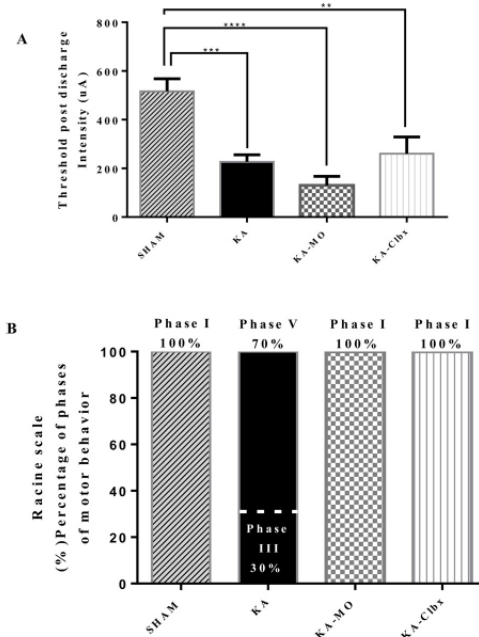


Fig. 2. A) Graphic showing the ADT values of the KA, KA-MO and KA-Clbx groups, where a significant decrease was observed, *** $p < 0.0025$, **** $p < 0.0001$ and ** $p < 0.0049$, respectively, compared to the SHAM control group. A 56% change was observed between the SHAM and KA groups, a 74.7% change between the SHAM and KA-MO groups and a 49.59% change between SHAM and KA-Clbx groups. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test, $p < 0.05$.

B) Graphic showing the percentage of rats in each group that exhibited changes in motor behavior during the ADT assessment using the modified Racine scale (Racine scale 1972). Seventy percent of the animals in the KA group presented a Stage V seizure corresponding to clonic tonic-type seizure activity, and 30% presented a Stage III seizure compared to the SHAM, KA-MO and KA-Clbx groups, where 100% of the rats presented a Stage I seizure.

KA-Clbx group, which had a p value < 0.003 . However, the KA group exhibited greater neuronal loss, $p < 0.0001$, than the KA-MO and KA-Clbx groups. Nonetheless, the KA-MO and KA-Clbx experimental groups showed a neuroprotective effect on the CA1 region, with greater than 31.84% and 46.20% changes, respectively, than the KA group (Fig. 5A and B).

In the CA3 area of the dorsal hippocampus, the KA group exhibited greater neuronal loss as compared with the SHAM control group ($p < 0.0001$), with a 65.9% change. Nevertheless, KA-MO and KA-Clbx groups, despite the reduced number of neurons in the KA-MO and KA-Clbx groups compared to the SHAM group ($p < 0.0001$); the former groups exhibited greater (42.35% and 45.5%) changes, respectively, than the KA group, which exhibited significantly fewer neurons compared to the treated groups ($p < 0.0001$). No significant differences were observed between the KA-MO and KA-Clbx groups; however, a minimal 5.5% change was observed, suggesting that both treatments exerted similar neuroprotective effects on the CA3 region (Fig. 6A).

In the granular layer of the dentate gyrus (DG), neuronal loss was present in the KA and KA-MO groups compared to the SHAM group ($p < 0.0001$), showing a 34% change between the SHAM and KA groups, and a 19.36% change between the SHAM and KA-MO groups. The number of neurons in the KA-Clbx group was preserved compared to the KA group ($p < 0.001$) and the KA-MO group ($p < 0.03$), showing a minimum 7.3% change from the SHAM group, indicating

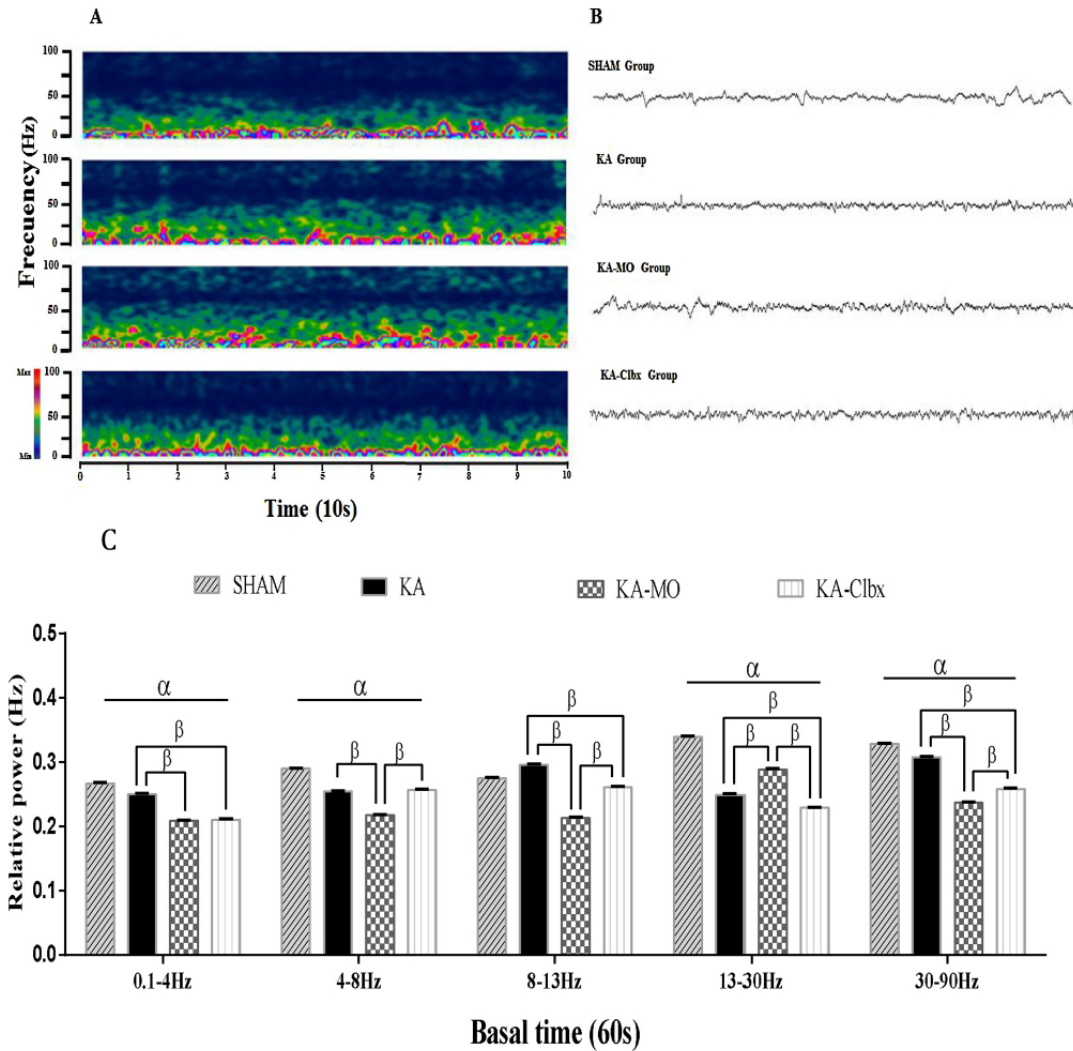


Fig. 3. A) Relative power spectra of different frequencies obtained from recordings under basal conditions, where the SHAM and KA groups showed homogenous electrographic activity compared to the KA-MO and KA-Clbx groups, which predominantly showed low frequency oscillations at 4–8 and 13–30 Hz. However, the values were significantly decreased $p < 0.0001$ and $p < 0.0001$ compared to the SHAM and KA groups, respectively. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test, $p < 0.05$.

B) Basal time: 1) Spectrograms (0.1–100 Hz) and 2) hippocampal electrographic activity obtained under basal conditions in the SHAM, KA, KA-MO and KA-Clbx groups. Color bar: red colors indicate maximum energy and blue colors indicate minimal energy.

that celecoxib reduces neuronal loss and the number of preserved neurons is similar to the SHAM group (Fig. 6B).

On the other hand, the ventral hippocampus showed a significant decrease in CA1 NeuN-positive neurons in the KA and KA-Clbx groups ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively), with a greater than 41.6% change in the KA group and 18% change in the KA-Clbx group compared to the SHAM group ($*p < 0.01$). Compared to the KA-Clbx group, the KA group showed a 28.8% decrease in the numbers of preserved neurons. The KA-MO group did not show significant differences from the other groups (Fig. 7A and C).

By other way, the number of neurons in the CA3 in the ventral hippocampus was only significantly decreased in the KA group compared to the SHAM group ($p < 0.01$), with a greater than 20% change.

However, no significant differences were observed between the KA-MO and KA-Clbx groups as compared with the SHAM and KA groups (Fig. 8A).

Regarding GD in the ventral hippocampus, a significant decrease in the number of neurons was observed in the KA group and to a lesser extent KA-MO group ($p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively), with 35.6% and 14.4% changes as compared to the SHAM group. The KA-Clbx and KA-MO groups showed a significant decrease ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively) compared to the KA group, with 31.45% and 24.7% changes observed in the KA-Clbx and KA-MO groups, respectively (Fig. 8 B).

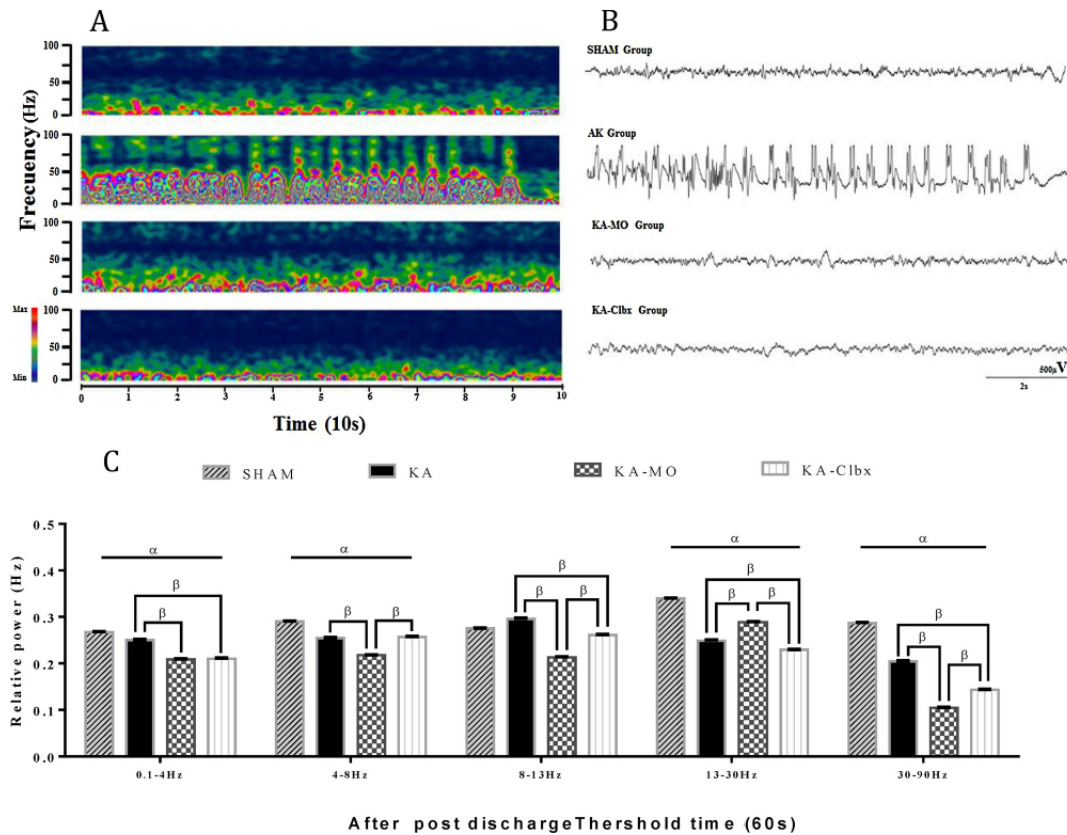


Fig. 4. A) Relative power spectra at different frequencies obtained from recordings. The SHAM group showed homogeneous electrographic activity in all bands, similar to baseline, and significant differences were observed compared to the KA, KA-MO and KA-Clbx groups ($\alpha p < 0.0001$). Decreased activity in the frequencies of 8–13 and 30–90 Hz was observed in the KA-MO and KA-Clbx groups, and decreased activity in the 30–90 Hz band was observed in the KA group after the ADT determination. The KA group predominantly showed activity in the 8–13 Hz band compared to the KA-MO and KA-Clbx groups ($\beta p < 0.0001$). One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test, $p < 0.05$. B) ADT time: 1) Spectrograms (0.1–100 Hz) and 2) hippocampal electrographic activity obtained after the ADT determination. Synchronous high-frequency activity was observed in the KA group and low-frequency activity was observed in the SHAM and KA-MO and KA-Clbx groups after the determination of the UPD. Color bar: red colors indicate maximum energy and blue colors indicate minimal energy.

3.4. Qualitative evaluation of GFAP

In the dorsal and ventral hippocampus, a greater number of GFAP-immunoreactive cells was observed in the CA1 region in the KA group, along with changes in the size and shape of the nucleus and an increase in astrocyte processes, indicating the presence of reactive gliosis. The KA-MO and KA-Clbx groups showed lower levels of CA1 gliosis (Fig. 5B and 7B).

4. Discussion

In the present study, a KA treatment during the early stages of development increased the susceptibility to seizures, neuronal damage and long-term gliosis, which are effects that are reduced by treatment with antioxidant (MO) and anti-inflammatory compounds MO and Clbx. Electrophysiological and imaging studies reveal that the seizures during postnatal development induces functional and structural changes in the hippocampal circuits that vary in a consistent form according to the age at which seizures are induced. These effects are observed after repeated brief seizures and prolonged SE in adults [Zhang et al., 2004; Sayin et al., 2015; Kubova et al., 2012].

The postnatal (PN) period of 10–15 days in rodents resembles the conditions of a human infant at 3–9 months of age [Zhang et al., 2004; Sayin et al., 2006] during this period, the GABAergic system generates an underlying inhibition of the glutamatergic excitatory system, which is focused on promoting the processes of plasticity and synaptogenesis. However, in this period, organisms are susceptible to damage caused by SE, which generates neuronal death in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus [Gobbo and O'Mara, 2004] as well as in the thalamic nuclei, mainly in the medial dorsal, dorsolateral and ventromedial nuclei. The extent and severity of the damage to this structure responsible for the propagation of the electrical activity to cortical structures depends on the age of the subject, with greater damage being reported during the period of days 12–15 PN in rats [Tremblay et al., 1984; Medvedev et al., 2002; Zhang et al., 2011].

In this model of repeated SE in day 10–14 PN rats induced by KA, a decrease in the latencies of the convulsive activity was observed from the second day of treatment with KA. The evolution of the convulsive behavior observed during this period was evaluated according to the development of the motor activity after injection. Several studies have attempted to identify the movements associated with the convulsive activity during motor development, and most of refer to 5 phases before

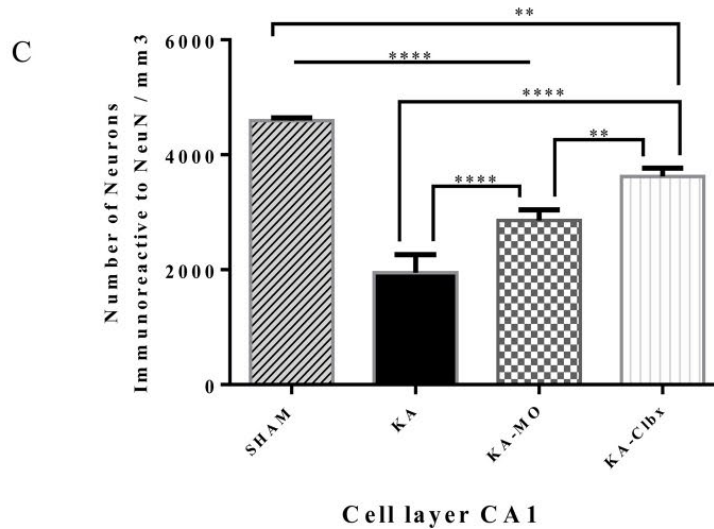
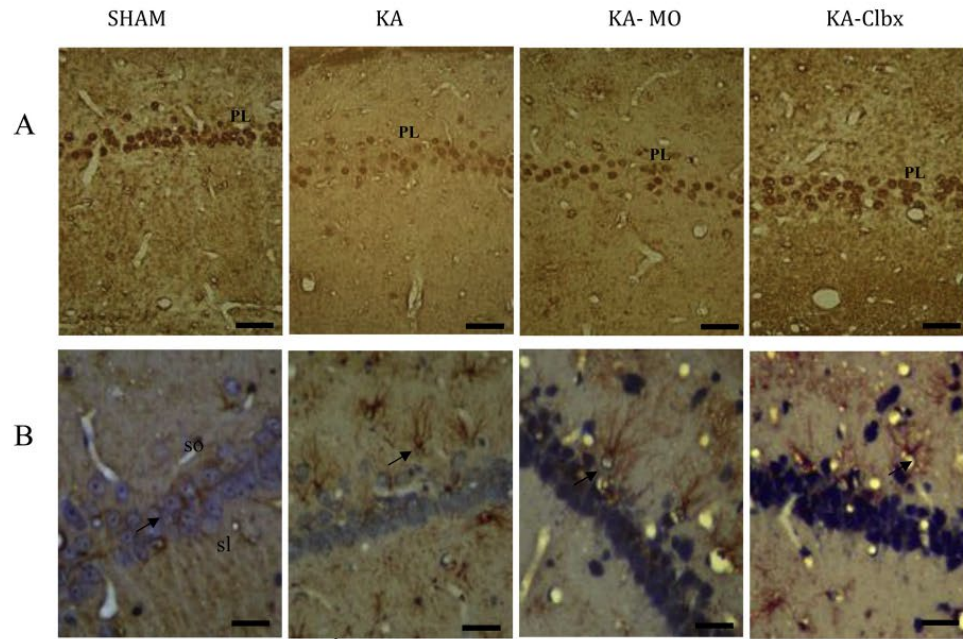


Fig. 5. A) CA1. A Photomicrographs that showing NeuN-immunoreactive neurons in the dorsal hippocampus, where observed neuronal preservation in the KA-MO and KA-Clbx as compared with KA. B) CA1. Photomicrographs that showing the GFAP-immunoreactive astrocytes (contrast with, hematoxylin) in the dorsal hippocampus, where the presence of reactive gliosis (fibrillar mesh) in CA1 is observed in the KA group in comparison with the KA-MO and KA-Clbx groups. (PL: pyramidal layer; so; stratum oriens, sl; stratum lucidum, sr; stratum radiatum). Scale bar A; 20 μ m and B; 10 μ m. C) CA1. Graphic showing the average number of NeuN-immunoreactive neurons \pm SEM in the dorsal hippocampus. A significant decrease was observed in the KA control group compared to the SHAM, KA-Clbx and KA-MO groups (**** $p < 0.0001$). A significant difference was observed between the KA-MO and KA-Clbx groups (** $p < 0.003$) and compared with the SHAM group (**** $p < 0.0001$ and ** $p < 0.003$, respectively).

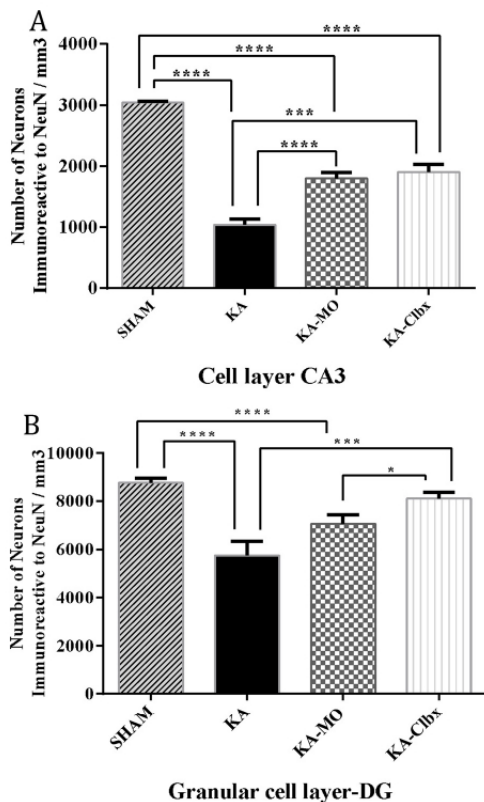


Fig. 6. A) CA3. Graphic showing the average number of NeuN-immunoreactive neurons \pm SEM in the dorsal hippocampus. A significant decrease was observed in the KA control group compared to the SHAM, KA-Clbx and KA-MO groups (**** $p < 0.0001$). A significant difference was observed between the KA-MO and KA-Clbx groups and compared with the SHAM group (**** $p < 0.0001$). B) Granular cell layer in the DG. Graphic showing the average number of NeuN-immunoreactive neurons \pm SEM in the dorsal hippocampus. A significant decrease was observed in the KA and KA-MO control groups compared to the SHAM group (**** $p < 0.0001$). The KA-Clbx group showed a preserved neuron as compared with the KA group (** $p < 0.001$) and the KA-MO group (* $p < 0.03$). One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test, $p < 0.05$.

the convulsive state in SE. SE is characterized by the presence of a continuous Phase V seizure for duration of no less than 10 min without any changes in behavior. At this stage, the movement of unilateral scratching and movement of bilateral scratching with lower extremities predominates [Ben-Ari et al., 1984,1985; Velíšek et al., 1985; Dzhalal et al., 2005]. The model created 100% reproducibility in the post-KA motor activity, indicating that it is a good SE model.

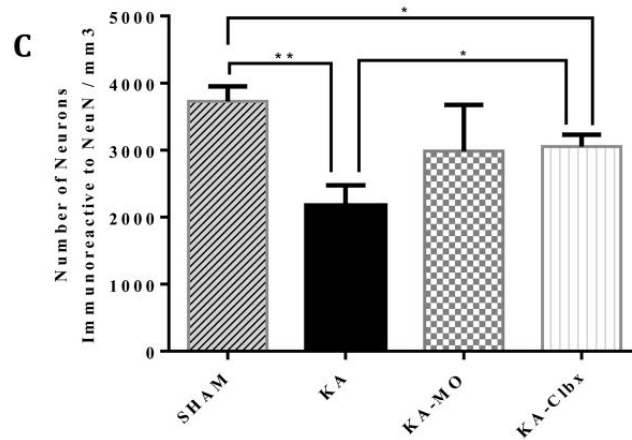
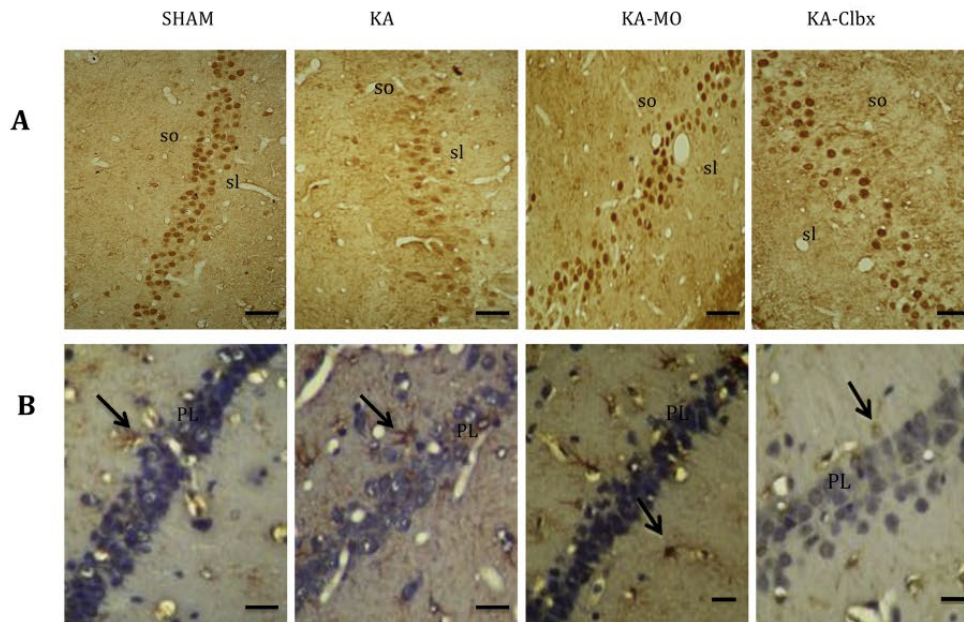
In the analysis of the electroencephalographic activity at day 90 PN, the SHAM group showed homogeneous activity in all the analyzed bands (0.1–4 Hz delta, 4–8 Hz theta, 8–13 Hz alpha, 13–30 Hz beta, and 30–90 Hz gamma) under baseline conditions. However, the KA group (76 days of treatment with KA) showed more activity in the 0.1–4 Hz, 4–8 Hz and 13–30 Hz bands, with an increase in the 8–13 and 30–90 Hz bands that is associated with neuronal hyperexcitability [61,64,65]. In contrast, the KA-MO group showed homogeneous activity in the 0.1–4 Hz, 4–8 Hz, and 8–13 Hz bands and greater activity in the 13–30 Hz band, similar to the KA-Clbx group, which displayed greater activity in the 4–8 Hz and 13–30 Hz bands. In both groups, low frequency oscillations were observed under baseline conditions, which

correlates with previously reported effects of selective inhibitors of COX-2 [Csicsvari et al., 2003; Temp et al., 2017].

On the other hand, during the determination of ADT, the KA group showed a 56% decrease in subthreshold values compared to the SHAM control group, which indicates a susceptibility to neuronal hyperexcitability. Moreover, 70% of rats in the KA group exhibited seizure activity of the clonic-tonic type (Phase V on the modified Racine scale) during the determination of the ADT. However, the KA-MO and KA-Clbx groups showed subthreshold values that were less than those of the SHAM group, with a 74.7% change in the KA-MO group and a 49.59% change in the KA-Clbx group. In the evaluation of motor behavior during the determination of ADT, 100% of the animals of the groups in the KA-MO and KA-Clbx groups presented only wet dog shaking, corresponding to a Phase I seizure on the modified Racine scale [Racine, 1972; Santana-Gómez et al., 2017]. This phenotype suggested the presence of ictogenesis in the hippocampus, a product of the damage induced by recurrent SE during in immature stage of rats aged 10–14 days PN [Moshe and Albala, 1983; Mareš and Kubová, 2016; Druga et al., 2005]. However, it also shows that early intervention in a neuroinflammatory response by means of treatments with *Magnolia officinalis* exerted a neuroprotective effect on the hippocampus and adjacent structures that in turn prevents the propagation of neuronal hyperexcitability during the determination of ADT [Temp et al., 2017]. However, the intervention with MO and celecoxib did not decrease the susceptibility to neuronal hyperexcitability.

Additionally, in the analysis of electroencephalographic activity after the ADT determination, the KA group predominantly showed prevalence of activity in the bands 0–4 Hz, 4–8 Hz and 8–13 Hz bands, with a decrease in high frequency oscillations (30–90 Hz). This response is associated with postictal activity [Valdes-Cruz et al., 2012; Santana-Gómez et al., 2017]. The homogeneous activity of the bands 0.1–4, 4–8 Hz and of 8–13 Hz was maintained, similar to the baseline period, but showed an increase in the activity of the 13–30 Hz band and decrease the activity of the 30–90 Hz band, similar to the KA group. These groups predominantly exhibited low frequency activity similar to the baseline period during the spectral analysis [Stafstrom et al., 1993; Schlichtiger et al., 2010; Borham et al., 2016]. This decrease in band power from 30 to 90 Hz in the hippocampus is associated with increases in the release of GABA and glutamate. Increased GABA release is induced by neuronal hyperexcitability, which acts as a compensatory mechanism to suppress the firing of glutamatergic neurons and to maintain the balance between arousal and inhibition [Rosillo-de la Torre et al., 2015].

The convulsive activity observed in the KA group was associated with damage in the DG and CA1 areas of the ventral hippocampus (Fig. 7C), which are reported to be more susceptible to SE-mediated damage due to their high contents of NMDA receptors that potentially promote generalized convulsive activity [Nairismagi et al., 2006; Wetherington et al., 2008]. This finding correlated with the results of the immunohistochemistry analysis of NeuN in the dorsal and ventral hippocampus. KA group showed neuronal loss in the CA1, CA3 and DG regions of the dorsal hippocampus, and the presence of reactive gliosis (hypertrophic glial cells and morphological feature of sclerotic tissue) marked by GFAP [Penkowa et al., 2001; Zhang and Zhu, 2011]. Additionally, the ventral hippocampus showed greater neuronal loss in the CA1 and DG regions, which may be associated with the decrease in the threshold and the subsequent induction of seizure activity. These alterations in the susceptibility to seizures in turn are linked to the neuroinflammatory response produced as a homeostatic mechanism to repair neuronal damage that promotes neuronal hyperexcitability and epileptogenesis if is not modulated in the proper spatiotemporal manner [Ravizza et al., 2005; 2006]. On the other hand, the KA-MO and KA-Clbx groups showed greater neuronal preservation and less gliosis in the CA1, CA3, and DG regions of the dorsal and ventral hippocampus, than the KA group, indicating that the neuroprotective effect of MO was attributed to its anti-inflammatory activity, similar to



Cell layer CA 1

Fig. 7. A) CA1. A photomicrograph that showing NeuN-immunoreactive neurons in the ventral hippocampus, where observed neuronal preservation in the KA-MO and KA-Clbx as compared with KA. B) CA1. A photomicrograph that showing the GFAP-immunoreactive astrocytes (contrast with, hematoxylin) in the ventral hippocampus, where the presence of reactive gliosis (fibrillar mesh) is observed in the KA group in comparison with the KA-Clbx and KA-MO groups. (PL: pyramidal layer; so; stratum oriens, sl; stratum lucidum, sr; stratum radiatum). Scale bar 30 μ m in A and 20 μ m in B.

C) CA1. A Graphic showing the average number of NeuN-immunoreactive neurons \pm SEM at ventral hippocampus, A significant decrease neurons was observed in the KA and KA-Clbx group** $p < 0.001$ * $p < 0.01$ respectively as compared with sham group, KA-Clbx showed a preserved neuron as compared with AK group. One-way ANOVA followed by one post-hoc Bonferronis, $p < 0.05$.

celecoxib, which reduces inflammatory mediators, decreases epileptic activity, and increases the seizure threshold in a early seizures model [Chen et al.,2011; Morales-Sosa et al., 2018].

The neuronal damage induced by KA has been studied extensively in

the rodent brain. The activation of kainate receptors in CA3 pyramidal neurons in the rodent hippocampus promotes the flow of intracellular Ca^{+2} , leading to excitotoxic damage with subsequent increases in reactive oxygen species (ROS), protease, lipase, and nuclease production,

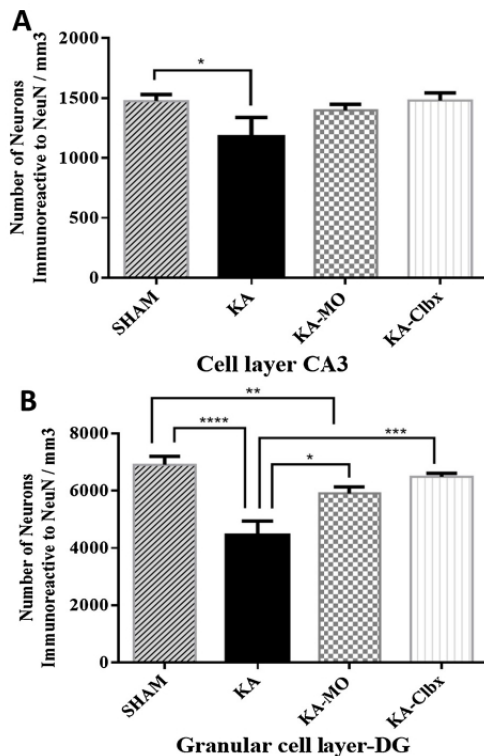


Fig. 8. A) CA3. A Graphing showing the average \pm SEM, of the number of NeuN-immunoreactive neurons in the CA3 at ventral hippocampus level, where a significant decrease was observed in the KA group $*p < 0.01$ as compared to the SHAM group. One-way ANOVA followed by a Bonferroni's post-hoc, $p < 0.05$.

B). A Graphic showing the average \pm SEM. Of the number of NeuN immunoreactive neurons in the granular cell layer-DG at the ventral hippocampus level where a significant decrease was observed in the KA group $***p < 0.01$ and $**p < 0.001$ for KA-MO group. The KA-Clbx and KA-MO groups showed a significant preserved neurons $***p < 0.001$ and $*p < 0.01$ respectively as compared with KA group. One-way ANOVA followed by a Bonferroni's post-hoc, $p < 0.05$.

as well as mitochondrial dysfunction and neuroinflammation, leading to neuronal death [Rizzi et al., 2003]. Neuronal death is accompanied by the activation of glia, mainly microglia and astrocytes, where the microglia are the main effector of the inflammatory response in the CNS (Central nervous system) [Kato and Walz, 2000; Penkowa et al., 2001; Brennan et al., 2009]. Gliosis is a pathological hallmark of an epileptic brain. It can contribute to the generation of recurrent spontaneous seizures in epilepsy [Brennan et al., 2009]. Astrocytes can impair homeostatic control of network excitability and abnormal synchronization of discharge in epilepsy. Multiple underlying mechanisms are proposed, such as spatial damping of K^+ , dysfunctional glutamate homeostasis [Brennan et al., 2009], dysfunctional gap junctions [De Lanerolle et al., 2010] and changes in calcium buffering and gliotransmitter release [Liu et al., 2018]. Therefore, under epileptic conditions astrocytes do not appear to be neuroprotective. In contrast, the activation of astrocytes induced by seizures could release proinflammatory cytokines and free radicals, which accelerate the loss of neurons [De Lanerolle et al., 2010; Brennan et al., 2009].

On the other hand, the genus *Magnolia* exerts anti-inflammatory effects on various models that are attributed to its main components magnolol and honokiol. The process these components target includes

glutamate-mediated excitotoxicity, by modulating the release of cytokines and proinflammatory proteins, such as COX-2, and decreasing the production of nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), prostaglandins and leukotrienes, which in turn promote lipoperoxidation and ROS generation [Oh et al., 2009a,b; Ku et al., 2011a,b; Lee et al., 2005; 2011a,b,c]. In addition to exerting anti-inflammatory effects on COX-2 in models of cerebral ischemia in rats, anticonvulsant effects have been reported in convulsive seizures models induced by pentylenetetrazol (PTZ) in adult rats. A 40% decrease in the latencies of motor behavior is attributed to its possible sedative effect, similar to diazepam, since honokiol binds to the alpha subunit of the GABA receptor. Honokiol may also participate in GABA synthesis by increasing the activity of the enzyme glutamate decarboxylase (GAD67) [Oh et al., 2009a,b; Ku et al., 2011a,b; Lee et al., 2011a,b,c] and magnolol exerted its anticonvulsant effects by acting through the GABA/benzodiazepine receptor complex in a PTZ model [Oh et al., 2009a,b; Chen et al., 2011; Lee et al., 2012]. Thus, *Magnolia officinalis* represents a potential alternative treatment that exerts neuroprotective effects on epileptogenesis in the early stages of neurodevelopment. The use of selective inhibitors of COX-2 such as Celecoxib showed more improved neuroprotective effect than *Magnolia officinalis*; however, chronic use is contraindicated in pediatrics due to its adverse effects. The mechanisms by which *Magnolia officinalis* exerts its anti-inflammatory effect are still not fully understood, which is why further studies are suggested.

Author contributions

VGA conceived and designed the experiments, produced and analyzed the results, and wrote the paper, SGC and MMV executed the electroencephalographic activity studies and the analysis of the results, RL, MOA and IFR evaluated the results and participated in the writing of the paper, BAV collaborated in the surgeries and the after-discharge threshold (ADT) studies, OSS were advisors for the research and participated in the writing of the manuscript.

Acknowledgments

We appreciate the technical assistance of the histotechnician, Carmen Baltazar, and the engineer, José Luis Duran Espinoza.

This work was supported by funds from the Health Research Fund by Mexican Institute of Social Security, Mexico IMSS, [Grant number FIS/IMSS/PROT/G12/1124], and CONACYT by scholarship 419352 to VGA.

References

- Albala, B.J., Moshé, S.L., Okada, R., 1984. Kainic-acid-induced seizures, a developmental study. *Dev Brain Res.* 13, 139–148.
- Ben-Ari, Y., Tremblay, E., Berger, M., Nitecka, L., 1984. Kainic acid seizure syndrome and binding sites in developing rats. *Dev Brain Res.* 316 (2), 284–288.
- Ben-Ari, Y., Tremblay, E., Ottersen, O.P., 1985. Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 5 (3), 515–528. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(80\)90049-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(80)90049-4).
- Blumenfeld, H., Westerveld, M., Ostroff, R.B., Vanderhill, S.D., Freeman, J., Necochea, A., Uranga, P., Tanheco, T., Smith, A., Seibyl, J.P., Stokking, R., Studholme, C., Spencer, S., Zubal, S., I, G., 2003. Selective frontal, parietal, and temporal networks in generalized seizures. *Neuroimage* 19 (4), 1556–1566. [https://doi.org/10.1016/S1053-8119\(03\)00204-0](https://doi.org/10.1016/S1053-8119(03)00204-0).
- Borham, L.E., Mahfoz, A.M., Ibrahim, I.A.A., Shahzad, N., Alrefai, A.A., Labib, A.A., Bin Sef, B., Alshareef, A., Khan, M., Millibary, A., Al Ghamdi, S., 2016. The effect of some immunomodulatory and anti-inflammatory drugs on Li-pilocarpine-induced epileptic disorders in Wistar rats. *Brain Res.* 1648 (Pt A), 418–424. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.07.046>.
- Brennan, A.M., Suh, S.W., Won, S.J., Narasimhan, P., Kauppinen, T.M., Lee, H., Edling, Y., Chan, P.H., Swanson, R.A., 2009. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat. Neurosci.* 12 (7), 857–863. <https://doi.org/10.1038/nn.2334>, 2009.
- Chen, C.R., Tan, R., Qu, W.M., Wu, Z., Wang, Y., Urade, Y., Huang, Z.L., 2011. Magnolol, a major bioactive constituent of the bark of *Magnolia officinalis*, exerts antiepileptic

- effects via the GABA/benzodiazepine receptor complex in mice. *Br. J. Pharmacol.* 164 (5), 1534–1546. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01456.x>.
- Cramer, S., Ebert, U., Loscher, W., 1998. Characterization of penytoin-resistant kindled rats, a new model of drug-resistant partial epilepsy: comparison of inbred strains. *Epilepsia* 10, 104–1053. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1998.tb01289.x>.
- Csicsvari, J., Jamieson, B., Wise, K.D., Buzsáki, G., 2003. Mechanisms of gamma oscillations in the Hippocampus of the behaving rat. *Neuron* 37, 311–322. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01169-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01169-8).
- De Lanerolle, N.C., Lee, T.S., Spencer, D.D., 2010. Astrocytes and epilepsy. *Neurotherapeutics* 7, 424–438. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.08.002>.
- Dichter, M.A., 2009. Emerging concepts in the pathogenesis of epilepsy and epileptogenesis. *Arch. Neurol.* 66 (4), 443–447. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.10>.
- Druga, R., Mares, P., Otáhal, J., Kubová, H., 2005. Degenerative neuronal changes in the rat thalamus induced by status epilepticus at different developmental stages. *Epilepsy Res.* 63 (1), 43–65. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2004.11.001>.
- Dube, C.A., Vezzani, M., Behrens, T., Bartfai, T., Baram, T.Z., 2005. Interleukin-1beta contributes to the generation of experimental febrile seizures. *Ann. Neurol.* 57 (1), 152–155. <https://doi.org/10.1002/ana.20358>.
- Dudek, F.E., Hellier, J.L., Williams, P.A., Ferraro, D.J., Staley, K.J., 2002. The course of cellular alterations associated with the development of spontaneous seizures after status epilepticus. *Prog. Brain Res.* 135, 53–65. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(02\)35007-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(02)35007-6).
- Dzhalil, V.I., Talos, D.M., Sdrulla, D.A., Brumback, A.C., Mathews, G.C., Benke, T.A., Delpire, E., Jensen, F.E., Staley, K.J., 2005. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat. Med.* 11 (11), 1205–1213. <https://doi.org/10.1038/nm1301>.
- Fernandez-Mas, R., Valdes, A., Martinez, A., Magdaleno, V., Almazán, S., Martínez, D., 1998. Graphical visualization of the transitions of the phases of the dream in the man: methods of three-dimensional representation. *Mental Health* 21, 27–32.
- Gobbo, O.L., O'Mara, S.M., 2004. Post-treatment, but not pre-treatment, with the selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib markedly enhances functional recovery from kainic acid-induced neurodegeneration. *Neuroscience* 125 (2), 317–327. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.01.045>.
- Hellier, J.L., Dudek, F.E., 2005. Chemocconvulsant model of chronic spontaneous seizures. *Curr. Protoc. Neurosci.* 9 (9), 19. <https://doi.org/10.1002/0471142301.n0919s31>.
- Irie, T., Miyamoto, E., Kitagawa, K., Maruyama, Y., Inoue, K., Inagaki, C., 2001. An anxiolytic agent dihydrohonkiole-B, inhibits ammonia-induced increases in the intracellular Cl⁻ of cultured rat hippocampal neurons via GABA_A receptors. *Neuroscience Lett.* 19 (2), 121–123. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)02201-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02201-7).
- Jensen, E.F., Baram, Z.T., 2000. Developmental seizures induced by common early-life insults: short and long-term effects on seizure susceptibility. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 6 (4), 253–257. [https://doi.org/10.1002/1098-2779\(2000\)6:4<253::AID-MRDD4>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1098-2779(2000)6:4<253::AID-MRDD4>3.0.CO;2-P).
- Kato, H., Walz, M., 2000. The initiation of the microglial response. *Brain Pathol.* 10 (1), 137–143. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2000.tb00250.x>.
- Ku, T.H., Lee, Y.J., Wang, S.J., Fan, C.H., Tien, L.T., 2011a. Effect of honkiole on activity of GAD65 and GAD67 in the cortex and hippocampus of mice. *Phytomedicine* 18 (13), 1126–1129. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.03.007>.
- Ku, T.H., Lee, Y.J., Wang, S.J., Fan, C.H., Tien, L.T., 2011b. Effect of honkiole on activity of GAD65 and GAD67 in the cortex and hippocampus of mice. *Phytomedicine* 18 (13), 1126–1129. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.03.007>.
- Kubová, H., Mareš, P., 2007. Hypoxia-induced changes of seizure susceptibility in immature rats are modified by vigabatrin. *Epileptic Disord.* 9 (1), S36–43. <https://doi.org/10.1684/epd.2007.0150>.
- Kubová, H., Lukasiuk, K., Pitkänen, A., 2012. New insight on the mechanisms of epileptogenesis in the developing brain. *Adv. Tech. Stand. Neurosurg.* 39, 3–44. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1360-8_1.
- Kuribara, H., Kishi, E., Hattori, N., 1996. Application of the elevated Plus-maze test in mice for evaluation of the content of honkiole in water extracts of *Magnolia*. *Phytother Res.* 13, 593–596.
- Laurén, H.B., Ruohonen, S., Kukko-Lukjanov, T.K., Virta, J.E., Grönman, M., Lopez-Picon, F.R., Järvelä, J.T., Holopainen, I.E., 2013. Status epilepticus alters neurogenesis and decreases the number of GABAergic neurons in the septal dentate gyrus of 9-day-old rats at the early phase of epileptogenesis. *Brain Res.* 21 (1516), 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.04.028>.
- Lee, J., Jung, E., Park, J., Jung, K., Lee, S., Hong, S., Park, J., Park, E., Kim, J., Park, S., Park, D., 2005. Anti-inflammatory effects of magnolol and honkiole are mediated through inhibition of the downstream pathway of MEK1 in NF- κ B activation signaling. *Planta Med.* 71 (4), 338–343. <https://doi.org/10.1055/s-2005-864100>.
- Lee, J.W., Lee, Y.K., Lee, B.J., Nam, S.Y., Lee, S.I., Kim, Y.H., Kim, K.H., Oh, K.W., Hong, J.T., 2011a. Inhibitory effect of ethanol extract of *Magnolia officinalis* and 4-O-methylhonkiole on memory impairment and neuronal toxicity induced by beta-amyloid. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95 (1), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.12.003>.
- Lee, J.W., Lee, Y.K., Lee, B.J., Nam, S.Y., Lee, S.I., Kim, Y.H., Kim, K.H., Oh, K.W., Hong, J.T., 2011b. Inhibitory effect of ethanol extract of *Magnolia officinalis* and 4-O-methylhonkiole on memory impairment and neuronal toxicity induced by beta-amyloid. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95 (1), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.12.003>.
- Lee, Y.J., Lee, M.Y., Lee, K.H., Jung, K.J., Han, S.B., Hong, T.J., 2011c. Therapeutic applications of compounds in the *Magnolia* family. *Pharmacol. Ther.* 130, 157–176. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.010>.
- Lee, Y.J., Choi, D.Y., Han, S.B., Kim, Y.H., Kim, K.H., Hwang, B.Y., 2012. Inhibitory effect of ethanol extract of *Magnolia officinalis* on memory impairment and
- Amyloidogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease via regulating β -secretase activity. *Phytotherapie* 26, 1884–1892.
- Li, Ch.Y., Chao, K.I., Wang, S.Ch., Chang, Z.H., Tsai, M.L., Fang, S.H., Liao, Ch.P., Ho, Ch.L., Chen, S.T., Cheng, W.Ch., Chiang, Ch.S., Kuo, Y.H., 2011. Honkiole inhibits LPS-induced maturation and inflammatory response of human monocyte derived dendritic cells. *J. Cell. Physiol.* 226, 2338–2349. <https://doi.org/10.1002/jcp.22576>.
- Liou, K.T., Shen, Y.C., Chen, C.F., Tsao, C.M., Tsai, S.K., 2007. Honkiole protects rat brain from focal cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting neutrophil infiltration and reactive oxygen species production. *Phytomedicine* 14 (10), 696–700. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.08.026>.
- Liu, J., Si, Z., Li, S., Huang, Z., He, Y., Zhang, T., Wang, A., 2018. The calcineurin inhibitor fl506 prevents cognitive impairment by inhibiting reactive astroglia in pilocarpine-induced status epilepticus rats. *Front. Cell. Neurosci.* 9 (11), 428. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00428.eCollection2017>.
- Löscher, W., Brandt, C., 2010. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol. Rev.* 62 (4), 668–700. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003046>.
- Luttjohann, A., Fabene, P.F., van Luitelaar, G., 2009. A revised Racine's scale for PTZ induced seizures in rats. *Physiol. Behav.* 98, 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.09.005>.
- Mareš, P., Kubová, H., 2016. Does status epilepticus induce at early postnatal period change excitability after cortical epileptic afterdischarges? *Epilepsia* 57 (8), e183–6. <https://doi.org/10.1111/epi.13438>.
- Martinez, A.L., Dominguez, F., Orozco, S., Chavez, M., Salgado, H., Gonzales, M., Trujano Gonzales, M.E., 2006. Neuropharmacological effects of an ethanol extract of the *Magnolia dealbata* Zucc leaves in mice. *J. Ethnopharmacol.* 106, 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.01.003>.
- Medvedev, A., Mackenzie, L., Hiscock, J.J., Willoughby, J.O., 2002. Kainic acid induces distinct types of epileptiform discharge with differential involvement of hippocampus and neocortex. *Brain Res. Bull.* 52 (2), 89–98. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90288-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90288-4).
- Morales-Sosa, M., Orozco-Suárez, S., Vega-García, A., Caballero-Chacón, S., Feria-Romero, I.A., 2018. Immunomodulatory effect of Celecoxib on HMGB1/TLR4 pathway in a recurrent seizures model in immature rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 170, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.05.007>.
- Moshe, S.L., Albala, B.J., 1983. Maturation changes in postnatal refractoriness and seizure susceptibility in developing rats. *Ann. Neurol.* 13, 552–557. <https://doi.org/10.1002/ana.410130514>.
- Nairismagi, J., Pitkänen, A., Kettunen, M.L., Kauppinen, R.A., Kubová, H., 2006. Status epilepticus in 12-day-old rats leads to temporal lobe neurodegeneration and volume reduction: a histologic and MRI study. *Epilepsia* 47 (3), 479–488. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00455.x>.
- NOM-062-ZOO, 1999. Technical Specifications for the Production, Care and Use of Laboratory Animals.
- Oh, I.H., Kong, L.L., Ban, J.O., Kim, Y.H., Kim, K.H., Han, S.B., Hong, J.T., 2009a. Antiinflammatory effect of 4-o methylhonkiole, compound isolated from *Magnolia officinalis* through inhibition of NF- κ B. *Chem. Biol. Interact.* 180 (3), 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.03.014>.
- Oh, I.H., Kong, L.L., Ban, J.O., Kim, Y.H., Kim, K.H., Han, S.B., Hong, J.T., 2009b. Antiinflammatory effect of 4-o methylhonkiole, compound isolated from *Magnolia officinalis* through inhibition of NF- κ B. *Chem. Biol. Interact.* 180 (3), 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.03.014>.
- Orozco-Suarez, S., Gonzales Ramirez, M., Castillo Medina, S., 2007. Effect of Neonatal Seizures on Brain Development in: *Neuroscience Research*. Bios-Mexico. Publishing Inc., Guadalajara, México, pp. 428–436.
- Paxinos, G., Watson, Ch., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, UK.
- Penkowa, M., Molinero, A., Carrasco, J., Hidalgo, J., 2001. Interleukin-6 deficiency reduces the brain inflammatory response and increases oxidative stress and neurodegeneration after kainic acid-induced seizures. *Neuroscience* 102, 805–818. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00515-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00515-7).
- Pernot, F., Heinrich, C., Barbier, L., Peinnequin, A., Carpentier, P., Dhote, F., Baille, V., Beaup, C., Depaulis, A., Dorandeu, F., 2011. Inflammatory changes during epileptogenesis and spontaneous seizures in a mouse model of mesiotemporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 52 (12), 2315–2325. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03273.x>.
- Pitkänen, A., Sutula, T.P., 2002. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol.* 1 (3), 173–181. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(02\)00073-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(02)00073-X).
- Polascheck, N., Bankstahl, M., Löscher, W., 2010. The COX-2 inhibitor parecoxib is neuroprotective but not antiepileptogenic in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Exp. Neurol.* 224 (1), 219–233. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.03.014>.
- Racine, R.J., 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32 (3), 269–279.
- Ravizza, T., Vezzani, A., 2006. Status epilepticus induces time-dependent neuronal and astrocytic expression of interleukin-1 receptor type I in the limbic system. *Neuroscience* 137 (1), 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.07.063>.
- Ravizza, T., Vezzani, A., 2018. Pharmacological targeting of brain inflammation in epilepsy: therapeutic perspectives from experimental and clinical studies. *Epilepsia Open* 3 (July (Suppl 2)), 133–142. <https://doi.org/10.1002/epi4.12242>.
- Ravizza, T.B., Gagliardi, F., Noe, K., Boer Aronica, E., Vezzani, A., 2005. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 29 (1), 142–160. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.08.012>.
- Ravizza, T.F., Noe, D., Zardoni, V., Vaghi, M., Sifringer, A., Vezzani, 2008. Interleukin

- converting enzyme inhibition impairs kindling epileptogenesis in rats by blocking astrocytic IL1 β production. *Neurobiol. Dis.* 31 (3), 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.05.007>.
- Rizzi, M., Perego, C., Aliprandi, M., Richichi, C., Ravizza, T., Colella, D., Veliskova, J., Moshe, S.L., De Simoni, M.G., Vezzani, A., 2003. Glia activation and cytokine increase in rat hippocampus by kainic acid induced status epilepticus during postnatal development. *Neurobiol. Dis.* 14 (3), 494–503. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.08.001>.
- Rosillo-de la Torre, A., Zurita-Olvera, L., Orozco-Suárez, A., García Casillas, P.E., Salgado-Ceballos, H., Luna-Bárceñas, G., Rocha, L., 2015. Phenytoin carried by silica core iron oxide nanoparticles reduces the expression of pharmacoresistant seizures in rats. *Nanomedicine* 10 (24), 3563–3577. <https://doi.org/10.2217/nmm.15.173>.
- Sankar, R., Auvin, S., Shin, D., Mazarati, A., 2007. Inflammation modifies status epilepticus-induced hippocampal injury during development. *Epilepsia* 48 (8), 16–18.
- Santana-Gómez, C.E., Orozco-Suárez, S.A., Talevi, A., Bruno-Blanch, L., Magdaleno-Madrigal, V.M., Fernández-Mas, R., Rocha, L., 2017. Propylparaben applied after pilocarpine-induced status epilepticus modifies hippocampal excitability and glutamate release in rats. *Neurotoxicology* 4 (59), 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.01.009>.
- Santana-Gómez, C.E., Valle-Dorado, M.G., Domínguez-Valentín, A.E., Hernández-Moreno, A., Orozco-Suárez, S., Rocha, L., 2018. Neuroprotective effects of levetiracetam, both alone and combined with propylparaben, in the long-term consequences induced by lithium-pilocarpine status epilepticus. *Neurochem Int.* 120, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.09.004>.
- Sayin, U., Hutchinson, E., Meyerand, M.E., Sutula, T., 2015. Age-dependent long-term structural and functional effects of early-life seizures: evidence for a hippocampal critical period influencing plasticity in adulthood. *Neuroscience* 288, 120–134. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.017>.
- Schlichtiger, J., Pekcec, A., Bartmann, H., Winter, P., Fuest, C., Soerensen, J., Potschka, H., 2010. Celecoxib treatment restores pharmacosensitivity in a rat model of pharmacoresistant epilepsy. *Br. J. Pharmacol.* 160 (5), 1062–1071. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00765.x>.
- Schmitz, C., Hofc, P., 2005. Design-based stereology in neurosciences. *Neuroscience* 130, 813–831. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.050>.
- Stafstrom, C.E., Chronopoulos, A., Thurber, S., Thompson, J.L., Holmes, G.L., 1993. Age-dependent cognitive and behavioral deficits after kainic acid seizures. *Epilepsia* 34 (3), 420–432. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1993.tb02582.x>.
- Tremblay, E., Nitecka, L., Berger, M.L., Ben-Ari, Y., 1984. Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. I. Clinical, electrographic and metabolic observations. *Neuroscience* 13 (4), 1051–1072. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90288-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90288-4).
- Valdes-Cruz, A., Negrete Diaz, J.V., Magdaleno-Madrigal, V.M., Martínez Vargas, D., Fernández-Mas, R., Almazan-Alvaro, S., 2012. Electroencephalographic activity in neonatal ventral hippocampus lesion in adult's rats. *Synapse* 66, 738–746. <https://doi.org/10.1002/syn.21563>.
- Velísk, L., Velísková, J., Moshé, S.L., 1985. Developmental seizure models. *Ital. J. Neurol. Sci.* 16 (1-2), 127–133.
- West, M.J., 1993. New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol. Aging* 275–285. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(93\)90112-O](https://doi.org/10.1016/0197-4580(93)90112-O).
- Wetherington, J., Serrano, G., Dingleline, R., 2008. Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron Rev.* 58 (2), 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.04.002>.
- Zayachkivsky, M.J., Lehmkuhle, J.H., Fisher, J.J., Ekstrand, F.E., Dudek, 2013. Recording EEG in immature rats with a novel miniature telemetry system. *J. Neurophysiol.* 109, 900–911. <https://doi.org/10.1152/jn.00593.2012>.
- Zhang, G., Raol, Y.S., Hsu, F.C., Brooks-Kayal, A.R., 2004. Long-term alterations in glutamate receptor and transporter expression following early-life seizures are associated with increased seizure susceptibility. *J. Neurochem.* 88 (1), 91–101. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02124.x>.
- Zhang, K., Tolstykh, G., Sanchez, R.M., Cavazos, J.E., 2011. Chronic cellular hyperexcitability in elderly epileptic rats with spontaneous seizures induced by kainic acid Status epilepticus while young adults. *Aging Dis.* 2 (4), 332–338 PMCID: PMC3295074.
- Zhang, X., Zhu, J., 2011. Kainic acid-induced neurotoxicity: targeting glial responses and glia-derived cytokines. *Curr. Neuropharmacol.* 9, 388–398. <https://doi.org/10.2174/157015911795596540>.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

N.º 127
Matrícula: 2141801645

Electroencefalograma de la
vacuola. Oficina sobre la
epilepsia en un modelo
de status epilepticus
presentado en 1981.
1981-1983.



ANGELICA VEGA GARCIA
ALUMNA

REVISÓ

MTRA ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA ADRIANA MARGARITA MORALES OTAL

VOCA

DRA HERMELINDA SALGADO CEBALLOS

VOCA

DRA LUISA LILIA ROCHA ARRIETA

VOCA

DRA IRIS ANGELICA FERIA ROMERO

SECRETARIA

DRA SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 17:30 horas del día 15 del mes de julio de. año 2020 por VÍA REMOTA ELECTRONICA, los suscritos miembros del Jurado designado por la Comisión del Proceso:

- DRA. ADRIANA MARGARITA MORALES OTAL
- DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS
- DRA. LUISA LILIA ROCHA ARRIETA
- DRA. IRIS ANGELICA FERIA ROMERO
- DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUAREZ

Bajo la Presidencia de la primera y con verificación de la Secretaría la última, se reunieron a la presentación de la disertación pública cuya denominación aparece al pie de la página para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

JE: ANGELICA VEGA GARCIA

y de acuerdo con el artículo 76 fracción IV de los Estatutos de Estados Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a los interesados el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, se fue tomada la protesta.

El presente documento cuenta con la firma -autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta - Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella