



Mecanismos fisiopatológicos que desencadenan procesos de muerte neuronal en la epilepsia del lóbulo temporal farmacorresistente

Lourdes Lorigados Pedre ^{1*} <http://orcid.org/0000-0003-4913-0706>

Lilia M. Morales Chacón ¹ <http://orcid.org/0000-0003-0205-0733>

Nancy Pavón Fuentes ¹ <http://orcid.org/0000-0003-0998-8601>

Teresa Serrano Sánchez ¹ <http://orcid.org/0000-0003-4311-2400>

María de los Ángeles Robinson ¹ <http://orcid.org/0000-0003-4808-0567>

María E. González Fraguela ¹ <http://orcid.org/0000-0002-6113-8818>

Mei Li Díaz Hung ¹ <http://orcid.org/0000-0002-7452-5374>

Iván García Maeso ¹ <http://orcid.org/0000-0002-9897-1678>

Bárbara Estupiñán Díaz ¹ <http://orcid.org/0000-0003-2084-2910>

Margarita M. Báez Martín ¹ <http://orcid.org/0000-0002-1442-896X>

Juan E. Bender del Busto ¹ <http://orcid.org/0000-0002-0715-3400>

Judith González González ¹ <http://orcid.org/0000-0002-5105-2789>

Richard Valdés Llerena ¹ <http://orcid.org/0000-0001-8196-2022>

Yaydelin Valdés Morales ¹ <http://orcid.org/0000-0003-3046-7894>

Sandra Orozco Suárez ² <http://orcid.org/0000-0001-5289-8500>

Luisa Rocha Arrieta ³ <http://orcid.org/0000-0003-4495-9427>

Juan M Gallardo Montoya ² <http://orcid.org/0000-0001-8833-4651>

¹ Centro de Investigaciones del Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN). La Habana, Cuba

² Unidad de Investigaciones Médicas de Enfermedades Neurológicas. Hospital Especialidades, México

³ Laboratorio de Farmacobiología, CINVESTAV. México

*Autor para la correspondencia: lourdes.lorigados@infomed.sld.cu

RESUMEN

Palabras clave

epilepsia del lóbulo temporal farmacorresistente; mecanismos fisiopatológicos; inflamación; estrés oxidativo, muerte neuronal

Introducción. La interrelación entre la inflamación, el estrés oxidativo y la muerte neuronal constituye un tema creciente de investigación sobre epilepsia del lóbulo temporal farmacorresistente (ELTF). Objetivo: profundizar en los mecanismos moleculares que participan en la fisiopatología de la ELTF correlacionando variables clínicas con inmunológicas, estrés oxidativo y muerte neuronal. **Métodos.** Por inmunocitoquímica fueron medidos los marcadores CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, HLA-DR; por nefelometría: IgG, IgM, IgA y albúmina; por ensayos inmunoenzimáticos, IL-1 β , IL-6, TNF- α y óxido nítrico; por Western blot: NF κ B, JNK, 4-hidroxi-2-nonenal, 3-nitrotirosina; por espectrofotometría: malondialdehído, productos avanzados de glicación (AGE), productos avanzados de oxidación proteínas, ácido úrico, superóxido dismutasa (SOD), glutatión y vitamina C; por inmunohistoquímica: Anexina V, TUNEL, sinaptofisina, caspasa 3, p53 y bcl-2; por HPLC, glutamato, y por autorradiografía: 5-HT, 5-HT1A, 5-HT7. **Resultados.** Se demuestra que las crisis son el substrato patogénico de los trastornos inmunológicos, inflamatorios y de estrés oxidativo en la ELTF. Las variables



clínicas se relacionan con los estudios moleculares y de proteínas realizados y todos en su conjunto evidencian la muerte neuronal en la ELTF.

Pathophysiological mechanisms that trigger neuronal death in drug-resistant temporal lobe epilepsy

ABSTRACT

Keywords

drug-resistant temporal lobe epilepsy; pathophysiological mechanisms; inflammation; oxidative stress; neuronal death

Introduction. In relation to drug-resistant temporal lobe epilepsy (DRTLE), the interrelation between inflammation, oxidative stress, and neuronal death constitutes a topic increasingly researched into. Objectives: To expand the knowledge of the molecular mechanisms that participate in the pathophysiology of DRTLE by correlating clinical variables with immunological ones, oxidative stress and neuronal death. **Methods.** Immunocytochemistry techniques were used to measure the markers CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, HLA-DR; Nephelometry was used for IgG, IgM, IgA, and Albumin; immunoenzymatic tests for IL-1 β , IL-6, TNF- α , and nitric oxide. By means of western blot: NF κ B, JNK, 4-hydroxy-2-nonenal, 3-nitrotyrosine; by means of spectrophotometry: malondialdehyde, advanced glycation products, advanced protein oxidation products, uric acid, superoxide dismutase, glutathione, and vitamin C; by means of immunohistochemistry: Annexin V, TUNEL, synaptophysin, caspase 3, p53, and bcl-2; by means of HPLC: glutamate and by means of autoradiography: 5-HT, 5-HT1A, 5-HT7. **Results.** It is shown that seizures are the pathogenic substrate of immunological, inflammatory and oxidative stress disorders in DRTLE. The clinical variables are related to the molecular and protein studies conducted and all together show the neuronal death in the DRTLE.

INTRODUCCIÓN

La epilepsia es un trastorno neurológico complejo que se caracteriza por la presencia de crisis espontáneas recurrentes. Se considera en la actualidad, una de las condiciones neurológicas más frecuentes. Los avances recientes sugieren la participación, para determinados tipos de epilepsia, de vías inmunitarias específicas en la patogenia de las crisis, aunque no está del todo dilucidado en el caso de la epilepsia del lóbulo temporal farmacorresistente (ELTF). Se han descrito cambios en parámetros de estrés oxidativo, excitotoxicidad y procesos de muerte apoptótica en la ELTF. ⁽¹⁻³⁾ No obstante, hasta la fecha se desconoce la real participación de mecanismos inmunológicos en diferentes localizaciones del foco epileptogénico en las epilepsias farmacorresistentes en general. Los estudios existentes, hasta el momento, explican o asocian la participación de la respuesta inmunitaria relacionada con la acción inmunosupresora de algunos fármacos antiepilépticos. ⁽⁴⁾ Una pregunta frecuente en la literatura es si los procesos inmunitarios son causa o consecuencia de las crisis o lo contrario. De igual forma, otro aspecto muy debatido es la necesidad de buscar marcadores de epileptogenicidad, así como conocer la participación del desbalance redox y de la muerte neuronal en la ELTF.

Los estudios realizados en este campo adolecen del análisis de parámetros clínicos, se desconoce la relación entre las variables clínicas como el estado libre de crisis después del tratamiento quirúrgico, el número de crisis por mes, el tiempo de evolución y la condición de mono o politerapia con las diferentes variables inmunitarias, inflamatorias y de estrés oxidativo.

El trabajo que aquí se presenta tiene como objetivo describir los mecanismos que participan en la fisiopatología de la ELTF desde el punto de vista inmunitario y de estrés oxidativo, neurotransmisión serotoninérgica, glutamatérgica y su vinculación con la muerte neuronal. Definir si estos mecanismos son causa o consecuencia de las crisis mediante un estudio evolutivo antes y después del tratamiento quirúrgico, así como describir la relación de diferentes variables clínicas con las inmunológicas, inflamatorias, de estrés oxidativo y de procesos de muerte neuronal. Como objetivo final de este estudio se pretende dar las bases para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas en aquellos pacientes farmacorresistentes, en los que la cirugía, no es una alternativa de tratamiento.

En esta investigación se describen mecanismos fisiopatológicos que operan en la ELTF. Mediante estrategias novedosas de investigación se aportan, a nivel internacional, evidencias de que las crisis son el substrato patogénico de los

trastornos de inmunidad, inflamación y estrés oxidativo en la ELTF y que las citocinas inflamatorias pueden ser marcadores de epileptogenicidad. De igual forma se sustenta que los procesos de muerte apoptótica y necrótica, así como los trastornos de inmunidad celular son dependientes de la localización del foco epileptogénico. Finalmente, se aporta una prueba de concepto necesaria para avalar el posterior uso en la clínica, de tratamientos que puedan modular tanto el sistema inmunitario como el estado redox de estos pacientes.

MÉTODOS

El presente trabajo se organizó en 4 estudios:

- I: Evaluación de la inmunidad en pacientes farmacorresistentes. Permitió la evaluación de la presencia de trastornos de inmunidad celular en pacientes con ELTF. Se evaluaron 30 pacientes con crisis parciales complejas farmacorresistentes con diferente localización del foco epileptogénico, un grupo con crisis psicógenas e igual medicación y un grupo control ($n = 15$). Los métodos empleados fueron la inmunocitoquímica para los marcadores linfocitarios y nefelometría para la inmunidad humoral.
- II: Estudio evolutivo de la inmunidad celular, marcadores de inflamación y estado redox en pacientes con ELTF y su relación con variables clínicas. Permitió el seguimiento evolutivo de parámetros inflamatorios, de inmunidad celular y de estrés oxidativo en pacientes con ELTF que recibieron tratamiento quirúrgico. Se estudiaron antes y después de la cirugía, tanto a nivel central en líquido cefalorraquídeo (LCR), tejido cerebral, como a nivel periférico un total de 20 pacientes para los marcadores de inmunidad celular, 10 para marcadores proinflamatorios y 18 para los parámetros de estrés oxidativo. Las herramientas tecnológicas utilizadas fueron inmunocitoquímica, reibergrama, nefelometría, ensayo inmunoenzimático y espectrofotometría.
- III: Muerte apoptótica y necrótica en pacientes con ELTF y relación con procesos inflamatorios y de estrés oxidativo. Permitió evaluar la presencia de marcadores de muerte apoptótica y necrótica en el tejido cerebral de los pacientes con ELTF, así como la relación de los marcadores de muerte con variables inflamatorias y de estrés oxidativo. Se estudiaron un total de 8 pacientes con ELTF y 5 tejidos cerebrales de pacientes fallecidos por causas no neurológicas. Los métodos empleados fueron inmunohistoquímica, conteo estereológico, evaluación por microscopía fluorescente, confocal y electrónica.

- IV: Neurotransmisión serotoninérgica y glutamatérgica en la ELTF. Permitió evaluar la neurotransmisión serotoninérgica mediante el estudio de unión de receptores al tejido neocortical de pacientes con ELTF y el seguimiento evolutivo del glutamato como marcador de excitotoxicidad en LCR, antes y después del tratamiento quirúrgico. Se estudiaron un total de 15 pacientes con ELTF y 6 tejidos cerebrales de pacientes fallecidos por causas no neurológicas para el estudio de autorradiografía y para la cuantificación de glutamato en LCR de 18 pacientes. Los métodos empleados fueron autorradiografía y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Aspectos éticos

Este trabajo forma parte del Proyecto de Cirugía de la Epilepsia del CIREN y para la ejecución del mismo se tuvieron en cuenta los principios que rigen la ética médica en el momento de realizar cada una de las evaluaciones en los pacientes. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado para la realización de la cirugía y la toma de las muestras para los estudios.

Análisis de los datos

Los valores se presentan como la media \pm EEM o la DE. Se realizó la prueba de distribución normal y homogeneidad de varianzas por medio de los test de Kolmogorov–Smirnov y Levene respectivamente. Se trabajó con un nivel de significación de 0.05 y para el análisis de los datos se empleó el software Statistica 8.0 (StatSoft Ink).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la inmunidad en pacientes farmacorresistentes

Se muestran alteraciones en parámetros inmunológicos celulares, referidas fundamentalmente al aumento de los linfocitos CD8+ ($p < 0,01$) y una disminución del índice CD4/CD8 ($p < 0,01$), de igual forma para los marcadores de activación CD25 y HLA-DR. Estas alteraciones solo se detectaron para los pacientes con localización temporal y lateralizada del foco epileptogénico (figura 1). No encontramos alteraciones en los niveles de las inmunoglobulinas G, M y A.⁽⁵⁾ La existencia de un grupo de pacientes con crisis de origen psicógeno que tomaba igual medicación y presentaba similar tiempo de evolución de la epilepsia en el que no detectamos trastorno de la inmunidad para ningún marcador, nos permitió afirmar que el déficit celular observado no depende del tratamiento antiepiléptico que toma el paciente.

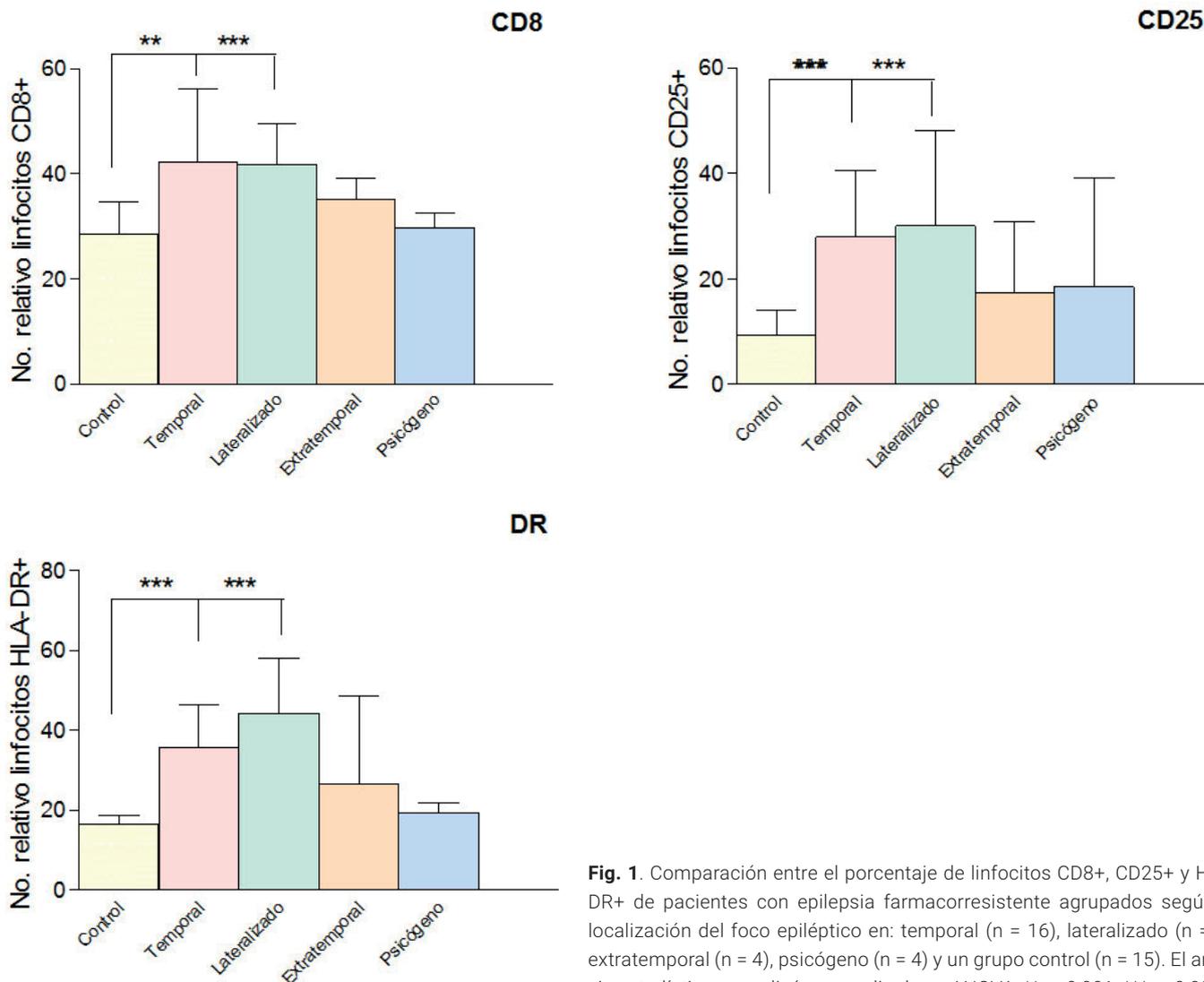


Fig. 1. Comparación entre el porcentaje de linfocitos CD8+, CD25+ y HLA-DR+ de pacientes con epilepsia farmacorresistente agrupados según la localización del foco epiléptico en: temporal (n = 16), lateralizado (n = 6), extratemporal (n = 4), psicógeno (n = 4) y un grupo control (n = 15). El análisis estadístico se realizó por medio de un ANOVA, **p ≤ 0,001, ***p ≤ 0,0001.

Si se toma en consideración que el grupo de pacientes diagnosticado como psicógeno recibía el mismo tratamiento antiepiléptico que el resto de los grupos, podríamos inferir que los cambios inmunológicos descritos pueden relacionarse con la patogenia de la epilepsia de localización ictal temporal o lateralizada y no con el tratamiento antiepiléptico utilizado. Las alteraciones inmunológicas encontradas referidas a la epilepsia refractaria a fármacos de localización temporal y lateralizada resultan de difícil explicación, no obstante, este fue el primer trabajo que describe la asociación entre trastorno inmunitario y localización del foco epileptogénico, más adelante, Liimatainen S y cols. describieron un resultado similar pero en parámetros inflamatorios.⁽⁶⁾ Estos hallazgos fueron la base de los siguientes estudios que profundizan en aspectos

tales como la evaluación inmunológica central mediante el estudio de diferentes marcadores linfocitarios en LCR, la evaluación de mediadores solubles de la respuesta inmunitaria (IL-1, IL-2, IL-6, TNF, etc.), así como el estudio de marcadores de activación y de forma novedosa, el estudio evolutivo antes y después de la cirugía, para poder conocer los efectos de este tratamiento sobre la función inmunitaria.

Por primera vez se describe la existencia de alteraciones inmunológicas de tipo celular asociadas a la localización del foco epileptogénico. Estas alteraciones no se observaron en un grupo de pacientes con crisis psicógenas, lo que asevera que las mismas no se deben al efecto inmunosupresor de algunos fármacos antiepilépticos, sino que pueden ser factores relevantes en la patogenia de las epilepsias focales farmacorresistentes.

Estudio evolutivo de la inmunidad celular, marcadores de inflamación y estado redox en pacientes con ELTF y su relación con variables clínicas

Seguimiento evolutivo de la inmunidad celular. Se evaluó en sangre y líquido cefalorraquídeo (LCR) la inmunidad celular y humoral en pacientes con ELTF que serían sometidos a cirugía de la epilepsia (lobectomías estándar ajustadas por electrocorticografía) antes y hasta dos años después de la misma. Antes del tratamiento quirúrgico se observó un incremento del porcentaje de los linfocitos CD8+, CD25+ y HLA-DR+ ($p < 0,01$) en ambos fluidos. Mientras que el estudio evolutivo después de la cirugía mostró una reducción a nivel periférico y central del porcentaje de los tres marcadores descritos (figura 2).⁽⁷⁾ El estudio del estado funcional de la barrera hematoencefálica (BHE) mostró que solo 5 pacientes tenían inflamación a nivel del sistema nervioso central y los mismos coincidían con ser los pacientes de mayor número de crisis por mes.

Según lo reportado en estudios previos, los pacientes con ELTF muestran una mayor expresión de microglia inmunorreactiva HLA-DR en el hipocampo⁽⁸⁾ y el presente estudio avala la expresión periférica y central de marcadores de activación

de linfocitos (CD25 y HLA-DR), así como de células T CD8+, este último efecto, según un estudio previo, es limitado a pacientes con localización de foco epileptogénico temporal y lateralizado.⁽⁵⁾ Se desconocen las implicaciones funcionales de estos hallazgos, pero respaldan la idea de que la respuesta inmunitaria de tipo celular puede ser intrínseca y quizás un biomarcador del proceso epileptogénico.^(9, 10) Este resultado tiene estrecha relación con la desaparición de las crisis en el 75 % de estos pacientes, hecho que nos permite afirmar que las crisis son el substrato patológico del déficit celular observado en estos pacientes.

El estudio evolutivo demostró que la alteración en la inmunidad celular desaparece una vez que el paciente está libre de crisis de forma significativa, hecho que sustenta que las crisis son el substrato patológico del déficit celular observado en la ELTF. De igual forma se constató que el mayor número de crisis por mes es un indicativo de mayor compromiso inflamatorio a nivel central.

Seguimiento evolutivo de citocinas proinflamatorias.

Se evaluó evolutivamente en suero marcadores proinflamatorios (IL-1 β , IL-6, TNF- α) y se observó que a partir del año

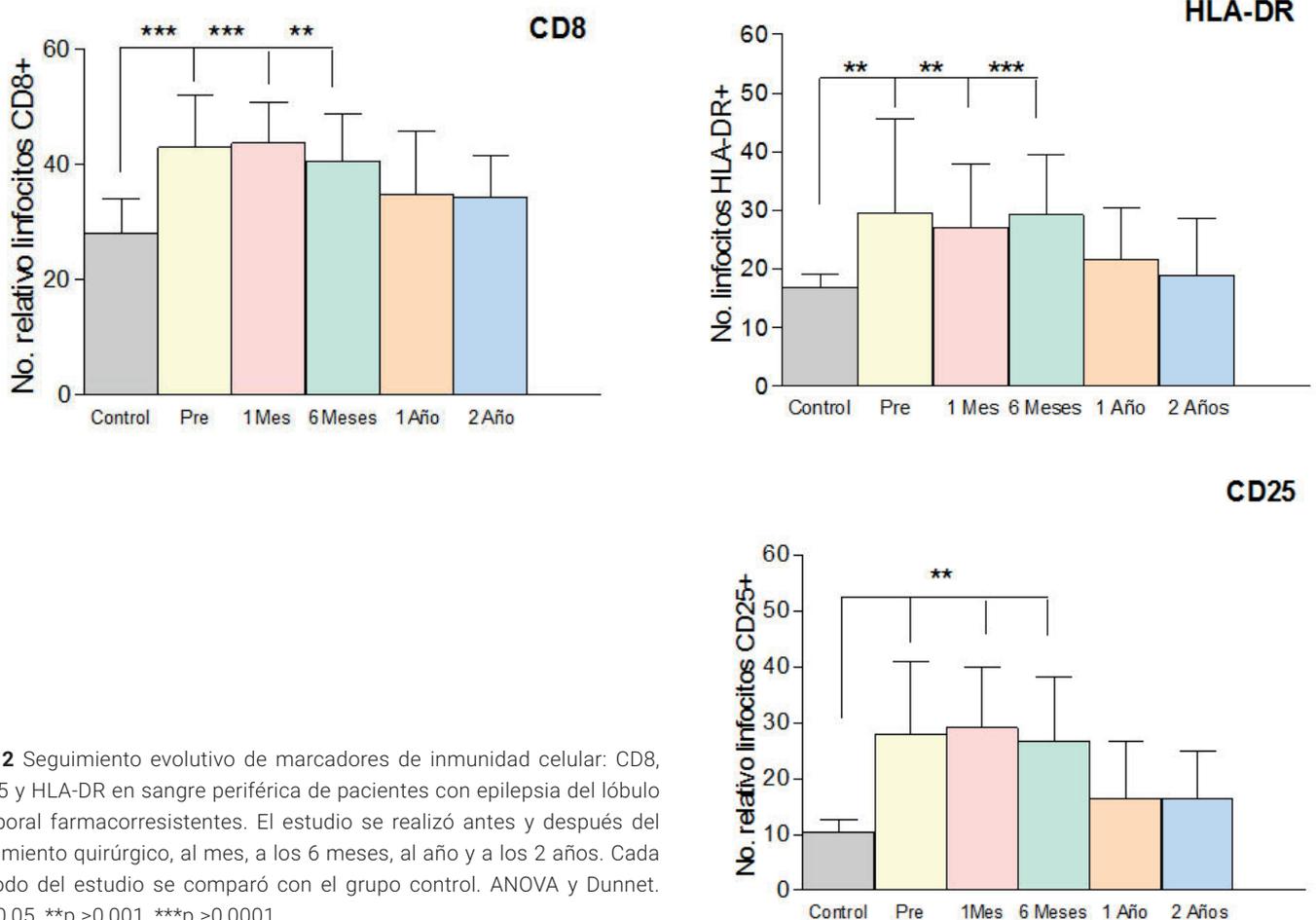


Fig. 2 Seguimiento evolutivo de marcadores de inmunidad celular: CD8, CD25 y HLA-DR en sangre periférica de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal farmacoresistentes. El estudio se realizó antes y después del tratamiento quirúrgico, al mes, a los 6 meses, al año y a los 2 años. Cada periodo del estudio se comparó con el grupo control. ANOVA y Dunnet. * $p \geq 0,05$, ** $p \geq 0,001$, *** $p \geq 0,0001$.

de evolución del tratamiento quirúrgico se produce una disminución de las concentraciones de estos marcadores, hecho que coincide en tiempo con la condición de libre de crisis en la mayoría (75 %) de los pacientes.^(7,11) Las concentraciones de estas citocinas en el tejido cerebral no fueron detectables en el grupo control mientras que en los pacientes mostraron cifras importantes.⁽⁷⁾ La comparación de las concentraciones de IL-1 β e IL-6 en los pacientes libres de crisis y los que no, mostraron mayores concentraciones en el grupo que continuaba presentando crisis lo que avala su potencial como marcador de epileptogenicidad (figura 3).

Un aspecto importante a evaluar es la integración de eventos inflamatorios que ocurren tanto periférica como centralmente. La evaluación de los niveles de IL-1 β y IL-6 en el tejido neocortical de pacientes con ELTF mostró valores que indican la presencia de un proceso inflamatorio a nivel central reforzado por la ausencia de estos marcadores en el tejido control. Anteriormente, otros autores respaldaron la no detección de concentraciones de citocinas proinflamatorias en el tejido cerebral de sujetos controles.⁽¹²⁾ Indistintamente en sangre o LCR, se documentó un aumento de IL-1 β y su receptor en astrocitos, microglia y neuronas en una serie de pacientes tratados quirúrgicamente por esclerosis del hipocampo. La IL-1 β y su receptor se expresan altamente en las neuronas y glía de los pacientes con epilepsia temporal causada por displasia cortical focal y tumores neurogliales, donde la expresión en el tejido cerebral es insignificante.⁽¹³⁾

En resumen, es posible afirmar que hay altas concentraciones de IL-1 β e IL-6 en los niveles sistémico y central que mantienen la presencia de una respuesta inflamatoria en la ELTF. La disminución de ambas citocinas después de la cirugía en pacientes con una reducción drástica de las crisis respalda la idea de que estos eventos son una causa importante de inflamación. La evaluación de la participación de los procesos inflamatorios en la ELTF tiene como objetivo responder

una pregunta básica: ¿La inflamación es parte de los procesos etiopatogénicos en la ELTF o las crisis son el resultado de trastornos inflamatorios? En este sentido, nuestros resultados describen la evidencia clínica de que una vez que el tejido epileptogénico ha sido resecado con la consiguiente eliminación de las crisis (o una reducción significativa de ellas), la inflamación observada desaparece. Este hallazgo apoya la hipótesis de que la inflamación podría ser principalmente la consecuencia de procesos epileptogénicos. De manera similar, este estudio respalda el criterio de la participación de la inflamación y la activación de vías tales como NF- κ B, y JNK y respaldan la aparición final de los procesos de muerte neuronal.

Seguimiento evolutivo del estado redox (EO). Se evaluaron de forma evolutiva las concentraciones séricas de malondialdehído, productos avanzados de oxidación a proteínas y glicación, óxido nítrico, glutatión, superóxido dismutasa, catalasa, ácido úrico, vitamina C y la expresión de 4-HNE y 3-NT (figura 4). Variables de EO fueron evaluadas en tejido cerebral. Los resultados prequirúrgicos mostraron un daño a lípidos y proteínas, así como afectación de antioxidantes, estos hallazgos se modificaron a valores normales al año de la cirugía.^(14,15) La correlación con variables clínicas demostró una relación positiva entre algunos parámetros de estrés oxidativo con el número de fármacos antiepilépticos y la frecuencia de las crisis por mes, mientras que la relación fue negativa, con la edad de inicio de las crisis.⁽⁷⁾

El marcador de estrés oxidativo que se asoció más fuertemente con la gravedad de la epilepsia fue 3-NT, que se considera como un marcador de estrés oxidativo dependiente de óxido nítrico, lo que indica que el estrés oxidativo es inducido por convulsiones y fármacos antiepilépticos, lo que resulta en la recurrencia de las crisis y la intratabilidad del fármaco. El sistema antioxidante que se correlacionó más negativamente con la gravedad de la epilepsia fue la vitamina C, que se asoció con un mayor número de convulsiones. Se detectaron ni-

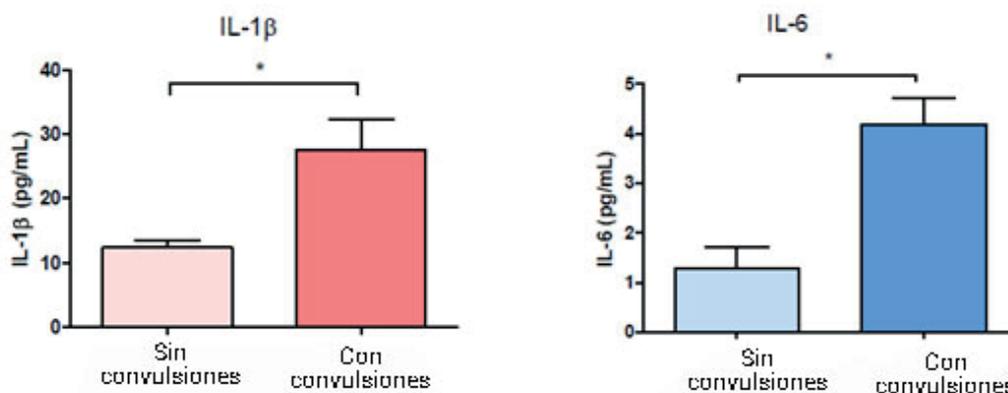


Fig. 3. Concentración en suero de interleucinas según la presencia o ausencia de crisis un año después de la cirugía. (A) IL-1 β . (B) IL-6. Las barras representan la media \pm el error estándar de la media. Prueba de Mann Whitney, * $p \leq 0,048$.

veles muy bajos de vitamina C en suero; Los bajos niveles de biomolécula antioxidante sugieren una capacidad de defensa antioxidante reducida en pacientes con epilepsia. Un resultado interesante de este estudio es la relación entre algunos oxidantes y multidroga.

Se reportó un desbalance del estado redox de los pacientes tanto a nivel sérico como central que evolutivamente se modifica después de la cirugía y que para algunos oxidantes y antioxidantes están relacionados con variables clínicas de relevancia en el seguimiento de los pacientes.

Muerte apoptótica y necrótica en pacientes con ELTF y relación con procesos inflamatorios y de estrés oxidativo

Evaluación de procesos de muerte apoptótica y necrótica en pacientes con ELTF. Se evaluaron en tejido neocortical la coexpresión de marcadores de muerte (Anexina V, TUNEL, caspasa 3, p53, bcl-2) y marcadores neuronales (sinaptofisina, NeuN). Se realizó un conteo neuronal por capas de la neocorteza y se apreció mayor pérdida neuronal en la capa IV. El conteo estereológico de los marcadores de muerte permitió avalar la pérdida neuronal en el tejido resecado, no así el conteo de la caspasa 3. Se evidenció por microscopia electrónica la presencia de ambos procesos de muerte: apoptótica y necrótica (figura 5).^(16, 17) La mayor pérdida neuronal es en

la capa IV de neocorteza y se producen ambos procesos de muerte: apoptótica y necrótica, siendo la apoptosis por una vía no dependiente de caspasas.

En resumen, nuestros resultados muestran la existencia de una correlación entre la disminución del número neuronal en la capa media de neocorteza de pacientes con ELTF y el incremento de la inmunodetección con Anexina-V y TUNEL, lo que habla a favor de la ocurrencia de un proceso de muerte neuronal en esta área cerebral que podría ser apoptótica por una vía no dependiente de caspasas, sin descartar la posibilidad de muerte necrótica, ya que el marcador TUNEL+ está asociado a ambos tipos de muerte; valoramos también la posibilidad de la presencia de una fase intermedia o de continuidad entre ambos tipos de muerte. Estos hallazgos proveen nuevas evidencias que podrían ayudar en el desarrollo de estrategias neuroprotectoras dirigidas contra los procesos de muerte celular que se desencadenan en la epilepsia.

Relación de los procesos de muerte con la inflamación y el estrés oxidativo. Las concentraciones de citocinas proinflamatorias se correlacionaron con el número de neuronas positivas a la Anexina V y el TUNEL, de igual forma diferentes parámetros de estrés oxidativo.^(7, 18) Se evidenció la expresión de moléculas reguladoras tanto de procesos inmunológicos, inflamatorios y de estrés oxidativo como JNK y NFκB en los pacientes con ELTF.

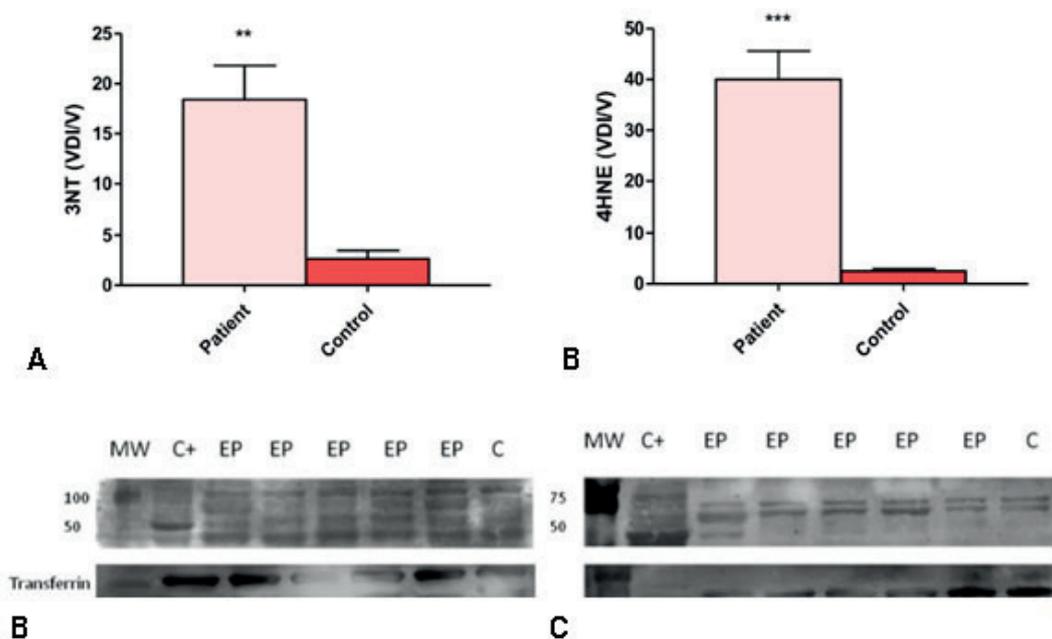


Fig. 4. Expresión de 3-nitrotirosina (3-NT) y 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal farmacorresistentes. A) Ejemplo representativo de la transferencia de 3-NT en un paciente y transferrina como proteína control. B) Ejemplo representativo de la transferencia de 4-HNE en un paciente y transferrina. C) Comparación de los valores de densidad óptica relativa de 3-NT en pacientes y sujetos control. D) Comparación de los valores de densidad óptica relativa de 4-HNE en pacientes y control.

Las barras representan las medias \pm el error estándar de la media. Prueba t-Student, ** $p \leq 0.003$, *** $p \leq 0.0001$. Se usó extracto de proteína de rata C + como control positivo en ambas transferencias. *Leyenda:* MW, peso molecular; EP, paciente con epilepsia; C, control.

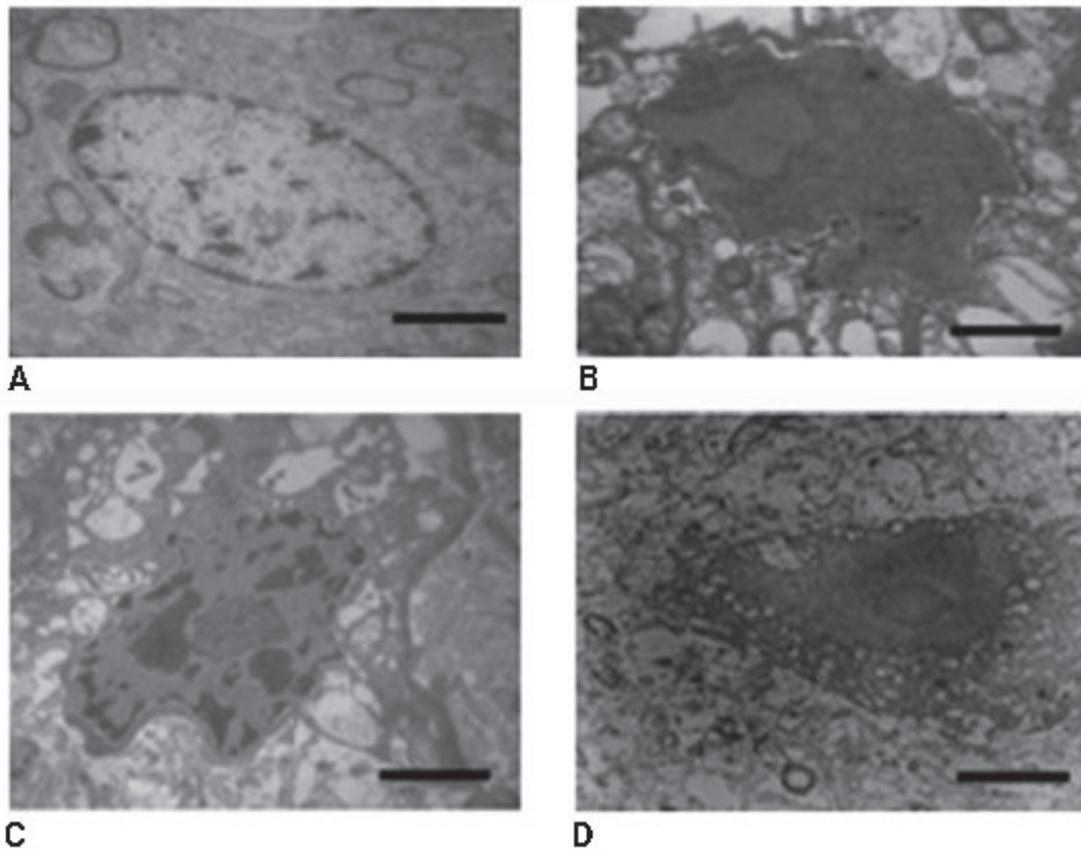


Fig. 5. Imagen de tejido neocortical de un paciente con epilepsia del lóbulo temporal farmacorresistente tomada con microscopía electrónica. A) Neurona normal. B) Neurona en proceso de muerte por necrosis. C y D) Neuronas en proceso de muerte por apoptosis. La barra equivale a 500 nm.

De forma novedosa estos estudios permitieron demostrar la relación entre los procesos fisiopatológicos inflamatorios y de estrés oxidativo con el proceso de muerte en el tejido cerebral y ayudaron a definir como marcadores de epileptogenicidad las citocinas proinflamatorias.

Neurotransmisión serotoninérgica y glutamatérgica en la ELTF

Se evaluó la unión en neocorteza de los receptores de serotonina y de su transportador, así como se midió la relación con variables clínicas. Se observó reducción de 5-HT y 5-HT_{1A}, aumento de 5-HT₄ y reducida unión del 5-HTT. Existió una correlación positiva entre la unión a los receptores 5-HT₄ y 5-HT₇ con la edad de inicio de las crisis, la duración de la epilepsia y del tratamiento antiepiléptico.⁽¹⁹⁾ La evaluación evolutiva de glutamato en el LCR mostró valores iniciales altos y una reducción de estos a medida que evolucionaba el tiempo posquirúrgico.

Este estudio indica un deterioro de la transmisión serotoninérgica en la neocorteza epiléptica que rodea al epiléptico en pacientes con ELTF. Apoya la relevancia de evaluar la unión

del receptor de serotonina en el tejido cerebral obtenido de pacientes epilépticos, con el propósito de revelar mecanismos que pueden conducir a epilepsia intratable.

El resultado de los cambios evolutivos en las concentraciones de glutamato sustenta la participación de eventos excitotóxicos en el cerebro de estos pacientes.

Consideraciones finales

En esta investigación se describen mecanismos fisiopatológicos que operan en la ELTF, mediante estrategias novedosas de investigación aportamos a nivel internacional evidencias de que las crisis son el substrato patogénico de los trastornos de inmunidad, inflamación y estrés oxidativo en la ELTF, demostramos que las citocinas pueden ser marcadores de epileptogenicidad, la participación de procesos de muerte apoptótica y necrótica y los trastornos de inmunidad celular son dependientes de la localización del foco epileptogénico. Otra novedad científica es que brindamos una prueba de concepto necesaria para sustentar el posterior uso en la clínica de tratamientos que puedan modular tanto el sistema inmunitario como el estado redox de estos pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. Inflammation and epilepsy. *HandbClinNeurol*. 2012;107:163-75.
2. Aguiar CC, Almeida AB, Araujo PV, de Abreu RN, Chaves EM, do Vale OC, et al. Oxidative stress and epilepsy: literature review. *OxidMedCell Longev*. 2012;2012:1-12.
3. Vezzani A, Lang B, Aronica E. Immunity and Inflammation in Epilepsy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2016;6(2).
4. Beghi E, Shorvon S. Antiepileptic drugs and the immune system. *Epilepsia*. 2011;52 Suppl 3:40-4. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03035.x:40-4.
5. Lorigados L, Morales L, Pavón N, Serrano T, Robinson MA, García ME, et al. Alteraciones inmunológicas en pacientes epilépticos asociadas a la localización del foco epileptogénico. *RevNeurol*. 2004;39:101-4.
6. Liimatainen S, Fallah M, Kharazmi E, Peltola M, Peltola J. Interleukin-6 levels are increased in temporal lobe epilepsy but not in extra-temporal lobe epilepsy. *JNeurol*. 2009;256(5):796-802.
7. Lorigados Pedre L, Morales Chacon LM, Pavon Fuentes N, Robinson Agramonte MLA, Serrano Sanchez T, Cruz-Xenes RM, et al. Follow-Up of Peripheral IL-1beta and IL-6 and Relation with Apoptotic Death in Drug-Resistant Temporal Lobe Epilepsy Patients Submitted to Surgery. *Behavioral sciences (Basel, Switzerland)*. 2018;8(2).
8. Beach TG, Woodhurst WB, MacDonald DB, Jones MW. Reactive microglia in hippocampal sclerosis associated with human temporal lobe epilepsy. *NeurosciLett*. 1995;191:27.
9. Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *NatRevNeurol*. 2011;7(1):31-40.
10. Friedman AR, Cacheaux LP, Ivens S, Kaufer D. Elucidating the Complex Interactions between Stress and Epileptogenic Pathways. *CardiovascPsychiatry Neurol*. 2011;2011:461263.
11. Lorigados Pedre L, Morales Chacon LM, Orozco Suarez S, Pavon Fuentes N, Estupinan Diaz B, Serrano Sanchez T, et al. Inflammatory mediators in epilepsy. *Current pharmaceutical design*. 2013;19(38):6766-72.
12. Choi J, Nordli DR, Jr., Alden TD, DiPatri A, Jr., Laux L, Kelley K, et al. Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. *JNeuroinflammation*. 2009;6:38:38.
13. Ravizza T, Gagliardi B, Noe F, Boer K, Aronica E, Vezzani A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *NeurobiolDis*. 2008;29(1):142-60.
14. Lopez J, Gonzalez ME, Lorigados L, Morales L, Riveron G, Bauza JY. Oxidative stress markers in surgically treated patients with refractory epilepsy. *ClinBiochem*. 2007;40(5-6):292-8.
15. Lorigados PL, Morales CL, Orozco SS, Rocha AL. Pharmacoresistant epilepsy and immune system. In: Rocha AL, Cavalheiro EA, editors. *Pharmacoresistance in Epilepsy From Genes and Molecules to Promising Therapies*. NY: Springer; 2013. p. 149-68.
16. Lorigados L, Orozco S, Morales-Chacon L, Estupinan B, García J, Rocha L. Excitotoxicity and neuronal death in epilepsy. *Biotechnology Aplicada*. 2013;30(1):9-16.
17. Lorigados PL, Orozco SS, Morales CL, Garcia MI, Estupinan DB, Bender del Busto JE, et al. Neuronal death in the neocortex of drug resistant temporal lobe epilepsy patients. *Neurologia*. 2008;23(9):555-65.
18. Lorigados Pedre L, Gallardo J, Morales Chacon LM, Vega Garcia A, Flores-Mendoza M, Neri-Gomez T, et al. Oxidative stress in patients with drug resistant partial complex seizure. *Behav Sci*. 2018;8(59):16.
19. Rocha L, Lorigados-Pedre L, Orozco-Suarez S, Morales-Chacon L, Alonso-Vanegas M, Garcia-Maeso I, et al. Autoradiography reveals selective changes in serotonin binding in neocortex of patients with temporal lobe epilepsy. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2007;31(6):1208-18.

Recibido: 20 de abril de 2020

Aprobado: 30 de mayo de 2020

Conflictos de interés. Los autores declaran que no hay conflicto de intereses en relación con la investigación presentada.

Contribución de autoría

1. Conceptualización: Lourdes Lorigados Pedre,
2. Curación de datos: Lourdes Lorigados Pedre, Lilia M Morales Chacón
3. Análisis formal: Lourdes Lorigados Pedre
4. Adquisición de fondos: Lourdes Lorigados Pedre
5. Investigación: Lourdes Lorigados Pedre, Lilia M Morales Chacón, Nancy Pavón Fuentes, Teresa Serrano Sánchez, María de los A Robinson Agramonte, María E González Fraguera, Bárbara Estupiñán Díaz, Margarita M Báez Martín, Juan E Bender del Busto, Judith González González, Ricardo Valdés Llerena, Yaydelin Valdés Morales, Sandra Orozco Suarez, Luisa Rocha Arrieta, Juan M Gallardo
6. Metodología: Lourdes Lorigados Pedre
7. Administración del proyecto: Lourdes Lorigados Pedre
8. Recursos: Lourdes Lorigados Pedre, Lilia M Morales Chacón, Sandra Orozco Suarez, Luisa Rocha Arrieta
9. Software: -
10. Supervisión: Lourdes Lorigados Pedre, Lilia M Morales Chacón
11. Validación: Sandra Orozco Suarez, Luisa Rocha Arrieta, Juan M Gallardo
12. Visualización: Lourdes Lorigados Pedre, Lilia M Morales Chacón
13. Redacción – borrador original: Lourdes Lorigados Pedre, Nancy Pavón Fuentes
14. Redacción – revisión y edición: Lourdes Lorigados Pedre

