

Perfil de estrés oxidativo y de modulación del sistema de adenosina: Relación con la epileptogenicidad y el riesgo de Muerte Súbita Inesperada en Epilepsia (SUDEP)

Oxidative stress and modulation of the adenosine system profile: Relationship with epileptogenicity and SUDEP risk

Lilia Morales Chacón¹  , Sandra Orozco Suarez², Lídice Galán García³, Nancy Pavón Fuentes⁴, Juan Manuel Gallardo⁵, Nelson Quintanal Cordero⁶, Antoni Camins Espuny⁷, Luisa Rocha Arrieta⁸.

¹Universidad Internacional de la Rioja, Logroño, España. Universidad de Barcelona.

²Unidad de Investigación Médica en Nefrología. Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional siglo XXI IMSS.

³Centro de Neurociencias de Cuba. La Habana. Cuba.

⁴Centro Internacional de Restauración Neurológica. La Habana. Cuba.

⁵Unidad de Investigación Médica en Nefrología. Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional siglo XXI IMSS.

⁶Fundación CENIT para la Investigación en Neurociencias. Buenos Aires. Argentina.

⁷Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

⁸CINVESTAV Sede Sur, México.

Autor para correspondencia. Lilia Morales Chacón. Universidad Internacional de la Rioja, Logroño, España. Universidad de Barcelona.

Dirección de correo electrónico: lilia.moraleschacon@unir.net

Cómo citar: Morales Chacón L, Orozco Suarez S, Galán García L, Pavón Fuentes N, Gallardo JM, Quintanal Cordero NE, et al. Perfil de estrés oxidativo y de modulación del sistema de adenosina: Relación con la epileptogenicidad y el riesgo de Muerte Súbita Inesperada en Epilepsia (SUDEP). *NeuroTarget*. 2025; 19(1):18-28. <https://doi.org/10.47924/neurotarget2025478>

Recibido: 06-07-2024

Revisado: 11-10-2024

Aceptado: 16-12-2024

Publicado: 01-01-2025

Editor: Dr. Sergio Sacchetti 

Resumen

Objetivo. Determinar la relación del perfil de estrés oxidativo y de modulación del sistema de adenosina con la epileptogenicidad y la estratificación del riesgo de muerte súbita inesperada en la epilepsia (SUDEP, por sus siglas en inglés) en pacientes con epilepsia focal farmacorresistentes (EFFR) temporal y extratemporal.

Método. Se evaluaron muestras de suero obtenidas de 21 pacientes con EFFR. Se estudiaron además controles sanos pareados en edad y sexo. Se determinaron las concentraciones séricas de adenosina de la peroxidación lipídica del malondialdehído (MDA), de la producción de óxido nítrico (NOx), productos avanzados de oxidación a proteínas y glicación (AGE), así como vitamina C. Se empleó un análisis de regresión múltiple para delinear los marcadores significativos asociados con las variables clínicas y el riesgo de SUDEP. Se realizó un análisis de clúster utilizando técnicas de validación basados en Bootstrap.

Resultados. Los valores de adenosina ($t(33)=1.87$, $p<0.05$) y las concentraciones séricas de los productos de estrés oxidativo fueron significativamente mayores en los pacientes que en los controles; AGE: $t(38)=2.577$, $p<0.01$, NOx: $t(37)=2.03$, $p<0.04$, MDA: $t(38)=3.62$, $p<0.0008$, VitC: $t(37)=2.52$, $p<0.016$. Existió una correlación directamente proporcional entre la edad de inicio de las crisis y las concentraciones séricas de AGE. ($t(5.12)=2.22$, $p<0.118$). La prueba de hipótesis univariada t-test mostró una tendencia a concentraciones más alta de adenosina en los pacientes con alto riesgo de SUDEP; 126.81 vs 95.58 ($t(16)=1.758$, $p=0.097$).

Conclusiones. En pacientes con EFFR existen perfiles incrementados de adenosina y de toxicidad por estrés oxidativo, más relevante en los pacientes con epilepsia del lóbulo temporal. Estos perfiles se relacionan con la epileptogenicidad, y resultan independientes de la medicación antiepileptica. En pacientes con EFFR con alto riesgo de SUDEP existe una tendencia a mayores concentraciones de adenosina, lo que sustenta la hipótesis de la adenosina en la fisiopatología de la SUDEP.

Palabras Claves: epilepsia focal farmacorresistente, stress oxidativo, adenosina, SUDEP

Abstract

Purpose. To determine the relationship between oxidative stress and modulation of the adenosine system profile with the epileptogenicity and stratification of sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP) risk in temporal and extratemporal drug-resistant focal epilepsy (DRFE).

Methods: Serum samples from 21 patients with EFFR were evaluated. Healthy participants matched for age and sex were also studied. Adenosine and serum concentrations of malonyldialdehyde (MDA) lipid peroxidation, nitric oxide (NOx) production, advanced protein oxidation and glycation products (AGE), and vitamin C were quantified. Multiple regression analysis (automatic, step-by-step) was used to delineate significant markers associated with clinical variables and SUDEP risk. A cluster analysis was performed using validation techniques based on bootstrap.

Results. Adenosine values were markedly greater in patients with DRFE ($t(33)=1.87$, $p<0.05$). Serum concentrations of oxidative stress products were also significantly higher in patients than in the control group: AGE ($t(38)=2.577$, $p<0.01$, NOx: $t(37)=2.03$, $p<0.04$, MDA: $t(38)=3.62$, $p<0.0008$, VitC: $t(37)=2.52$, $p<0.016$). There was a proportional directly correlation between the seizure onset age and serum AGE concentrations. ($F(5,12)=2.22$, $p<0.118$). The univariate hypothesis test (t-test) showed a trend towards higher adenosine concentrations in patients with high SUDEP risk: 126.81 vs 95.58 ($t(16)=1.758$, $p=0.097$).

Conclusions: There are increased profiles of adenosine and oxidative stress toxicity in DRFE patients, with higher prevalence in temporal lobe epilepsy patients. These profiles are associated with epileptogenicity, and are not influenced by anti-seizure medication. In DRFE patients at high SUDEP risk there is a tendency toward higher adenosine concentrations, lending support to the adenosine hypothesis in SUDEP pathophysiology.

Keywords: drug-resistant focal epilepsy, oxidative stress, adenosine, SUDEP

Introducción

La epilepsia es una enfermedad neurológica crónica caracterizada por una propensión a la generación de crisis epilépticas recurrentes, que afecta a aproximadamente a 70 millones de personas en todo el mundo.¹ A pesar del incremento en la disponibilidad de medicamentos anticrisis (MAC) en las últimas décadas, se estima que hasta el 40% de las personas con epilepsia se consideran médicamente intratables o fármacorresistentes.²

La Liga Internacional de Lucha contra la Epilepsia (International League Against Epilepsy, ILAE por sus siglas en inglés), define la epilepsia farmacorresistente (EFR) como la falla en el control de las crisis con dos esquemas terapéuticos en mono o politerapia y que hayan sido bien tolerados, dosificados de forma correcta y seleccionados en dependencia del tipo de crisis.³

La epilepsia del lóbulo temporal mesial es el prototipo de epilepsia farmacorresistente, es la causa más frecuente de epilepsia en el adulto con una respuesta al tratamiento quirúrgico de un 70% o más. En tanto, en la epilepsia extratemporal (EET), en la cual las crisis se originan fuera del lóbulo temporal, el 20% tienen su zona de inicio en el lóbulo frontal. Las principales etiologías asociadas a este sitio son: los tumores (20-30%), las displasias corticales (58%), las malformaciones vasculares (6-14%) y las lesiones postraumáticas craneoencefálicas (20%).⁴

Los procesos patogénicos de generación y recurrencia de las crisis, especialmente en las EFR, son objeto de intensas investigaciones clínicas y preclínicas. El desequilibrio en los neurotransmisores excitatorios e inhibitorios, la neuroinflamación, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial, son algunos de los mecanismos patogénicos comunes de los trastornos neurológicos y de las epilepsias.⁵⁻⁷ Existen numerosos estudios que avalan la contribución del estrés oxidativo a la patogenia de la epilepsia.^{6,8-11} La evidencia muestra que el aumento de la excitabilidad neuronal, sello distintivo de la epilepsia, se acompaña de neuroinflamación y de una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno. Estos factores son probablemente características claves del inicio y la propagación de las crisis, así como de las comorbilidades asociadas.¹²

La evidencia experimental apoya la implicación del estrés oxidativo en el proceso de generación de las crisis epilépticas y en los mecanismos asociados a la refractariedad a la terapia farmacológica.^{13,14} Un estudio realizado en modelo animal de epilepsia del lóbulo temporal, respalda la hipótesis de que los cambios redox se correlacionan con la actividad convulsiva en las epilepsias adquiridas, independientemente de los insultos desencadenantes, y sugieren el estrés oxidativo como un objetivo terapéutico potencial para su tratamiento.¹⁵ En modelos animales de la epilepsia del lóbulo temporal (ELT), también se han mostrado indicadores de peroxidación lipídica y de formación de aldehídos, así como niveles reducidos de antioxidantes, incluida la vitamina E. Otros antioxidantes

como el glutatión, la superóxido dismutasa y la catalasa, también han mostrado valores elevados.¹⁶⁻²⁰

Asimismo, en muestras de cerebro humano resecadas quirúrgicamente durante la cirugía de las EFR, se ha observado el daño inducido por las especies reactivas de oxígeno (ERO) a las biomoléculas, lo que sugiere la contribución del estrés oxidativo a la hiperexcitabilidad neuronal y la neurodegeneración.^{21,22}

Por otro lado, varios estudios han demostrado que la adenosina base nucleósida de purina, precursora del trifosfato de adenosina o ATP, que se utiliza ampliamente en todo el organismo en el metabolismo general, participa en un amplio espectro de funciones diferentes, como la citogénesis y la epileptogénesis (procesos que convierten un cerebro normal en un cerebro epiléptico). Estas funciones la realiza a través de mecanismos dependientes e independientes del receptor, y se conoce que la adenosina quinasa (ADK), como enzima clave para la eliminación de adenosina, puede exacerbar las crisis epilépticas no solo acelerando la eliminación de adenosina, sino también aumentando la metilación global del ADN a través de la vía de transmetilación.²³ Asimismo, la adenosina está involucrada en el control de la plasticidad sináptica anormal y la neurodegeneración y juega un papel importante en la expresión de síntomas comórbidos y complicaciones de la epilepsia, como la muerte súbita inesperada en la epilepsia (SUDEP).²⁴

En los pacientes con EFR, las crisis epilépticas incontroladas, así como la exposición a altas dosis de múltiples medicamentos ineficaces, resultan en comorbilidades considerables que incluyen desde trastornos cognitivos, conductuales, psiquiátricos, lesiones físicas, hasta la muerte súbita inexplicable en epilepsia.^{3,25}

La disfunción en los sistemas de señalización de la serotonina y la adenosina constituyen mecanismos planteados en la etiología de la SUDEP.^{26,27} Se postula que la liberación exagerada de adenosina está involucrada en el cese de las crisis y en la supresión postictal del electroencefalograma.^{28, 29} La serotonina por su parte participa en la regulación de la respiración, los estados de sueño/vigilia, la excitación y la modulación de las crisis, implicándose así en la fisiopatología de la SUDEP.³⁰

La hipótesis de la adenosina en la SUDEP propone que la estimulación de la adenosina en el período postictal media la depresión del despertar y la respiración en pacientes con epilepsia.³¹ Se ha planteado que el sistema de adenosina está desregulado en las epilepsias y que cambios mal adaptativos en el metabolismo de la adenosina pueden explicar la epileptogenicidad, la epileptogénesis, así como las comorbilidades y complicaciones de esa enfermedad, como la SUDEP.

Se ha encontrado en tejido resecado de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal asociada a esclerosis del hipocampo sometidos a cirugía, un marcaje menor del receptor astroglial de adenosina A2A en la corteza temporal en el grupo con mayor riesgo de SUDEP, lo que sugiere alteración de la modulación de la adenosina.²⁷ De particular relevancia resulta

que la estimulación de la amígdala media la apnea en las crisis epilépticas. Un estudio reciente reportó aumento del receptor AIR neuronal en la amígdala en el grupo con mayor riesgo de SUDEP.³²

Hasta aquí abordamos un grupo de evidencias de que el estrés oxidativo, la neuroinflamación y el sistema de adenosina, actúan como modificadores de la enfermedad en las epilepsias adquiridas, especialmente en las EFR.

En modelos animales de epilepsia se ha demostrado que la medicación anticrisis y los antioxidantes administrados durante la epileptogénesis reducen la carga de convulsiones en roedores. Estos tratamientos ofrecen neuroprotección y mejoran el déficit cognitivo. Por otro lado, tomando como base los hallazgos de que la adenosina y sus análogos pueden suprimir las crisis farmacorresistentes, ha surgido un nuevo campo de terapias basadas en adenosina, incluido el uso de agonistas del receptor de adenosina e inhibidores del transporte de adenosina. Sin embargo, la mayoría de estos enfoques farmacológicos están limitados por fuertes efectos secundarios sistémicos que van desde una disminución de la frecuencia cardíaca, la presión arterial y la temperatura corporal hasta la sedación.³³

Los marcadores de estrés oxidativo y de los sistemas de opioides endógenos, los cuales se evalúan en sangre, tejidos o mediante estudios de neuroimágenes, pudieran representar biomarcadores pronósticos y predictivos comprobables para seleccionar la población de pacientes con alto riesgo de desarrollar epilepsia y comorbilidades asociadas y ser, por lo tanto, elegibles para tratamientos novedosos.

Así las cosas, los objetivos del presente trabajo fueron examinar: (a) si los pacientes con epilepsias farmacorresistentes se caracterizan por un aumento de la toxicidad del estrés oxidativo y del sistema de adenosina y (b) si estos parámetros están asociados con la epileptogenicidad y la estratificación del riesgo de SUDEP.

Método

Se evaluaron muestras de suero obtenidas de 21 pacientes con epilepsia focal resistente al tratamiento farmacológico. Se estudiaron además controles sanos pareados en edad y sexo. Se consideró EFR a aquellos pacientes que no lograron control de las crisis epilépticas con el uso de dos esquemas terapéuticos suministrados en mono o politerapia y que fueron bien tolerados, dosificados de forma correcta y seleccionados en dependencia del tipo de crisis.

En las muestras de sangre se determinaron los marcadores de stress oxidativo y de adenosina.

- Metodología para la determinación de Adenosina

Para este estudio se utilizó un kit de ensayo de cuantificación de adenosina (No. Catálogo, MAK433 de Sigma-Aldrich; Merck; Darmstadt, Alemania); en este ensayo se utilizó 50 μ l de muestras de suero que se procesaron por un método fluorométrico para la detección de adenosina, que se basa en un enfoque enzimático de varios pasos, que da lugar a la formación de un producto fluorescente que se mide a λ_{Ex} =

550 nm/ λ_{Em} = 585. El kit tiene un rango lineal de 0 a 20 μ M, que se calcula en base a una curva de calibración con Adenosina desaminasa.³⁴

- Metodología para la determinación de los marcadores de estrés oxidativo

Se evaluaron las concentraciones séricas de la peroxidación lipídica malondialdehído (MDA), de la producción de óxido nítrico (NOx), productos avanzados de oxidación a proteínas y glicación AGE, y vitamina C.

- Determinación de la peroxidación lipídica (MDA)

El malondialdehído es el producto final de la peroxidación de los ácidos grasos y un marcador de la actividad de los radicales libres. Para la medición de la concentración de peroxidación lipídica en suero se utilizó el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) descrito por Wade y van Rij.³⁵ Aunque el TBA no sólo se limita a la medición del MDA, es el método más empleado para determinar la oxidación lipídica y por lo tanto el estrés oxidativo. En resumen, a 50 μ l de suero se le añadió 1 mL de TBA (Acros Organics, Bélgica) al 0.7% y se incubó a 90 °C durante 60 min. La reacción de color se midió espectrofotométricamente (532 nm). Se utilizó al tetrametoxipropano como estándar. La concentración de MDA (medido como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBAR) se calculó como μ mol/L.³⁵

- Determinación de la producción de óxido nítrico (NOx)

La medición de NOx se realizó mediante la determinación de la cantidad total de nitritos (NO₂-), que son los productos estables del metabolismo del NOx. Se utilizó el reactivo de Griess (solución acuosa de sulfanilamida al 1% y naftilenoetilendiamina al 0.1% en H₃PO₄ (al 2.5%, JT Baker), el cual forma un cromóforo estable con NO₂-, y que absorbe a 546 nm.¹⁵ La curva de calibración se hizo con diferentes concentraciones de nitrito de sodio disuelto en NaCl al 0.9%.³⁶

- Determinación de los productos avanzados de oxidación de proteínas y glicación

La determinación de AGE se basa en la detección fluorométrica según Henle et al.³⁷ Las muestras de plasma se centrifugaron a 15000 g durante 15 min, a 4°C. A continuación, el plasma se diluyó 1:50 (v/v) con solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH de 7,4 y se registró la intensidad de la fluorescencia emitida a una longitud de onda de 440 nm, después de la excitación a 350 nm, utilizando un espectrofluorómetro (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Electron Corporation). La intensidad de la fluorescencia se expresó en unidades arbitrarias por gramo de proteína (AUF/g proteína).³⁷

- Determinación de Vitamina C

Una alícuota de 0,1 mL de solución de muestra que contenía una especie reductora (en agua, metanol, etanol, sulfóxido de dimetilo o hexano) se combinó en un tubo cónico con 1 mL de solución de reactivo (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sodio 28 mM y molibdato de amonio 4 mM). Los tubos se taparon y se incubaron en un bloque térmico a 95°C durante 90 min. Una vez que las muestras se enfriaron a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de la solución acuosa de

cada una a 695 nm frente a un blanco. Una solución de blanco típica contenía 1 mL de solución de reactivo y el volumen apropiado del mismo solvente utilizado para la muestra, y se incubó en las mismas condiciones que el resto de las muestras. Para muestras de composición desconocida, las capacidades antioxidantes solubles en lípidos y solubles en agua se expresaron como equivalentes de ácido ascórbico.³⁸

Análisis estadístico general

Para el procesamiento estadístico se utilizó el programa Statistica 8.0 Copyright StatSoft.Inc. 1984-2007. Se realizó el análisis estadístico media, desviación estándar y prueba de t de Student. Se consideró como estadísticamente significativo al valor de $p < 0.05$. Se empleó un análisis de regresión múltiple (automático, paso a paso) para delinear los marcadores significativos que están asociados con las variables clínicas y el riesgo de SUDEP. Se realizó un análisis de clúster utilizando técnicas de validación basados en bootstrap.

Consideraciones Éticas

Previo a su inclusión, se les brindó a los pacientes toda la información requerida, se aclararon dudas y se solicitó la firma del consentimiento por escrito. El estudio se realizó con

el cumplimiento de las buenas prácticas clínicas (BPC), aprobado por los Comités de Ética para la Investigación Clínica, conforme a lo promulgado en la Declaración de Helsinki: principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos.

Resultados

En la tabla 1 se muestran los datos clínicos y demográficos de los pacientes evaluados en este estudio. La media de edad fue de $32,38 \pm 12,92$. La duración de las crisis osciló entre 8 y 46 años, con una media de $22,09 \pm 11,48$. El 61,9% (13/21) de los pacientes tenían el diagnóstico electro clínico de epilepsia extratemporal. Como se muestra en la tabla 1, todos los pacientes tomaban entre 2 y 6 MAC. Los medicamentos más usados fueron Carbamazepina, Lamotrigina, Clobazam y Clonazepam. La dosis diaria de Carbamazepina utilizada por los pacientes osciló entre 400 y 1500 mg, con una mediana en los niveles séricos de 8,78 micromol/l. La dosis de Lamotrigina osciló entre 150 y 400 mg/día, con una mediana en los niveles séricos de 5,68 micromol/l. La frecuencia semanal de las crisis fue muy variable entre 1 y 1000 (mediana de 7 crisis/semana). La puntuación total de la escala SUDEP-7 tuvo una mediana de 6, categorizada como SUDEP alto.

Tabla 1. Datos clínicos y demográficos de los pacientes evaluados.

	Edad (años)	Edad inicio de las crisis (años)	Duración de la epilepsia (años)	Sexo	Tipo epilepsia/lateralización del inicio ictal	Medicamentos anticrisis	SUDEP-7 puntuación total
1	19	8	11	M	EXT	LTG, Clobazam	7
2	33	8	25	F	T	AVP, LTG, Leve	4
3	23	8	14	M	EXT	CBZ, LTG, Fb, AVP, Nitr	7
4	22	7	15	M	T	LTG, Clob, CBZ	3
5	26	9	17	F	EXT	CBZ, Clob	7
6	23	15	8	F	EXT	Leve, Fn, Lacosamida, Cannabis, Fb, Lorazepam	5
7	32	20	12	F	T	LTG, Clob	3
8	38	1	37	F	T	CBZ Clob	6
9	23	4	19	M	EXT	CBZ, Clon	6
10	27	11	16	M	EXT	CBZ, Clon	4
11	18	6	12	M	EXT	AVP,LTG, Leve, Clob	7
12	65	51	14	F	T	CBZ, LTG,Clob	7
13	43	10	33	M	T	CBZ Clob	6
14	54	15	39	F	T	CBZ, LTG	9
15	28	7	21	M	EXT	CBZ, Clob	4
16	36	1	35	F	EXT	CBZ, LTG	5
17	36	14	22	F	EXT	CBZ, Clob	6
18	48	8	40	M	EXT	CBZ, Clon, Clob	5
19	18	6 meses	17	M	EXT	CBZ, fenitoina	5
20	21	11	10	F	EXT	Leve, Clob, Fn	4
21	47	1	46	F	T	CBZ	7

F: femenino; M: masculino, T: epilepsia focal del lóbulo temporal, EXT: epilepsia focal extratemporal, CBZ: carbamazepina, LTG: Lamotrigina, Clob: Clobazam, Clon: Clonazepam, Leve: Levetiracetam, Fn: Fenitoina, Fb: Fenobarbital, AVP: Acido Valproico, Nitr: Nitrazepam

Se constataron diferencias significativas en las concentraciones séricas de adenosina y los marcadores de estrés oxidativo entre pacientes y controles. Los valores de adenosina fueron significativamente mayores en los pacientes con EFR, con $p < 0.05$, $t(33) = 1.87$; Figura 1.

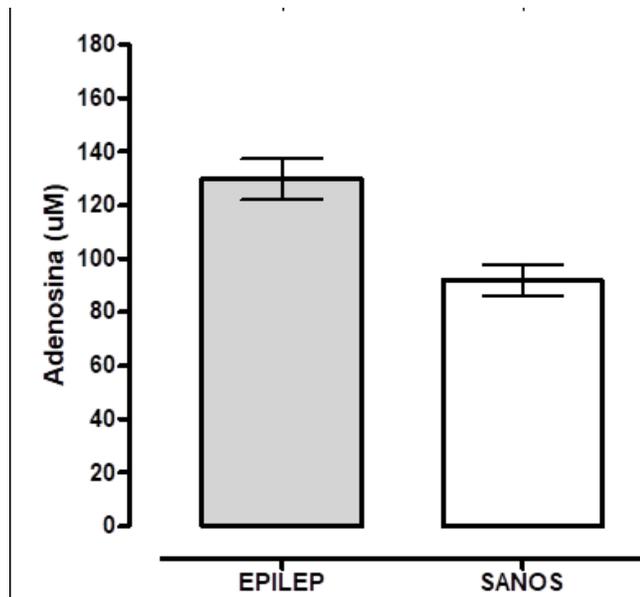


Figura 1. Muestra las concentraciones séricas de adenosina en pacientes y controles. Los valores de adenosina fueron significativamente mayores en los pacientes con EFR $p < 0.05$, $t(33) = 1.87$.

Las concentraciones séricas de los productos de estrés oxidativo también fueron significativamente mayores en los pacientes que en los controles AGE: $t(38) = 2.577$, $p < 0.01$; NOx: $t(37) = 2.03$, $p < 0.04$, MDA: $t(38) = 3.62$, $p < 0.0008$; VitC: $t(37) = 2.52$, $p < 0.016$. Figura 2.

Se realizó un análisis exploratorio basado en el análisis de clúster, utilizando técnicas de validación basados en bootstrap. Se contruyeron tres clúster utilizando los marcadores evaluados en el estudio: concentraciones séricas de adenosina, AGE, NOx, MDA y Vitamina C. Al evaluar los clúster obtenidos, precisamos que en el clúster 1 el mayor porcentaje de casos corresponde a los pacientes, en el clúster 3 la mayoría de las observaciones corresponden a controles en el 83,3% (10/12), en tanto en el clúster 2 existe una mezcla, siendo una combinación a razón de 7:5 controles vs pacientes. Se realizaron pruebas de hipótesis para comparar el comportamiento de las variables clínicas y demográficas que corroboraron las diferencias encontradas entre pacientes y controles a partir del análisis univariado. (Figura 3).

Cuando consideramos en el análisis de clúster solo el grupo de pacientes, se constata que la mayoría de los mismos con ELT se ubican en el cluster 2 (71.43%). Nótese que en el clúster 2, los indicadores de estrés oxidativo y adenosina son mas altos. Las diferencias estadísticamente significativas se

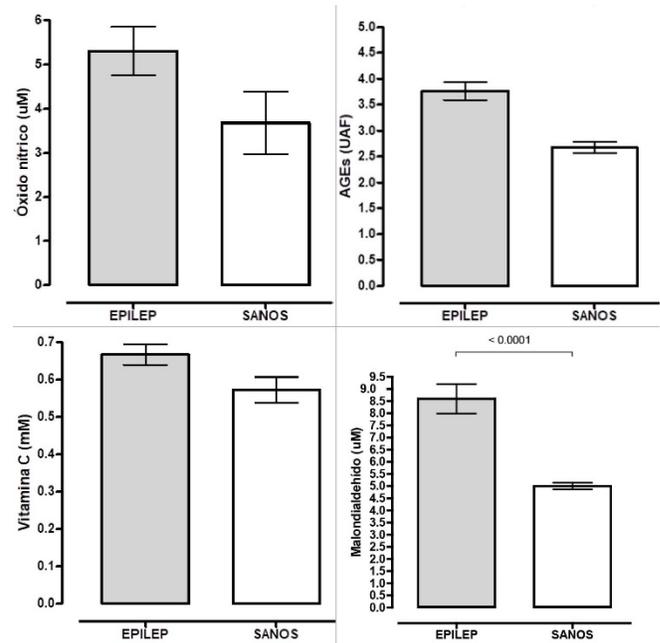
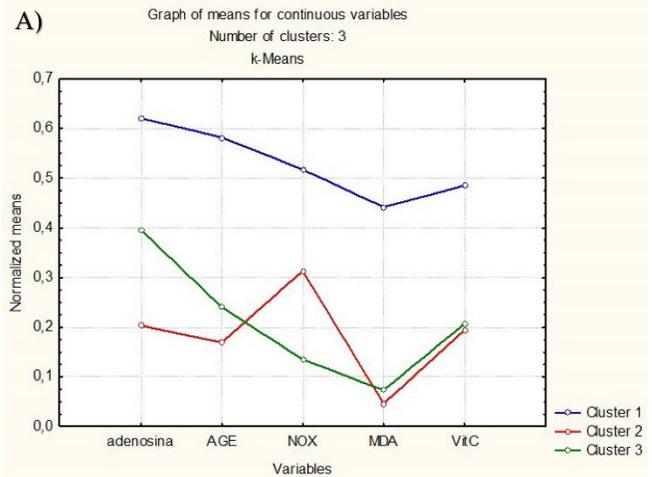


Figura 2. Muestra concentraciones séricas de los marcadores de estrés oxidativo de pacientes y controles. Los valores de adenosina fueron significativamente mayores en los pacientes con relacion con los controles sanos. AGE: $t(38) = 2.577$, $p < 0.01$, NOx: $t(37) = 2.03$, $p < 0.04$, MDA: $t(38) = 3.62$, $p < 0.0008$, VitC: $t(37) = 2.52$, $p < 0.016$.



Clúster	Concentración				
	Adenosina	AGE	NOx	MDA	Vitamina C
1	140.33	3.96	9.11	11.89	0.913
2	76.34	2.60	5.57	4.91	0.567
3	105.92	2.83	2.48	5.39	0.58

Figura 3. A) Representa los clúster obtenidos utilizando técnicas de validación basados en bootstrap, utilizando las concentraciones séricas de adenosina, AGE, NOx, MDA, y Vitamina C de pacientes y controles. En el clúster 1, el mayor porcentaje de casos corresponde a los pacientes; en el clúster 3, la mayoría de las observaciones corresponden a controles con el 83,3% (10/12). En tanto, en el clúster 2 existe una mezcla, siendo una combinación a razón de 7:5 controles vs pacientes. B) Concentraciones séricas de adenosina, AGE, NOx, MDA, y Vitamina C en los clúster.

constatan para las concentraciones de AGE $t(16)=2.15$, $p=0.047$. Estos resultados sugieren que en pacientes con ELT, la toxicidad del estrés oxidativo, especialmente la oxidación de proteínas y las concentraciones de adenosina, están más incrementadas que en las epilepsias extratemporales. (Figura 4). Este resultado depende de la variable duración de las crisis; en el clúster 1, la duración de las crisis epilépticas fue de 17.20 ± 8.37 , en tanto en el 2 fue de 27.5 ± 10.5 , $t(16)=2.313$, $p=0.03$.

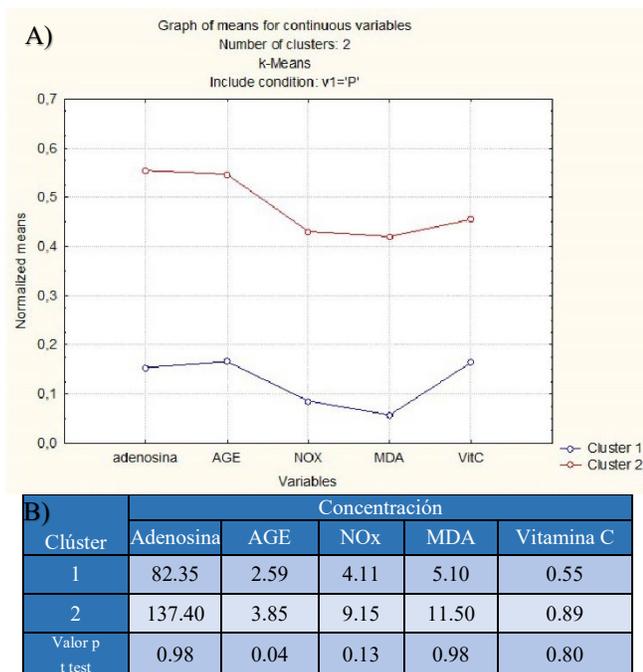


Figura 4. A) Representa los clúster obtenidos utilizando técnicas de validación basadas en bootstrap utilizando las concentraciones séricas de adenosina, AGE, NOx, MDA, y Vitamina C de pacientes con epilepsia farmacoresistentes. En el clúster 2 se ubican la mayoría de los pacientes con ELT (71.43%). Nótese que en el cluster 2 los indicadores de estrés oxidativo y adenosina son más altos. B) Concentraciones séricas de adenosina, AGE, NOx, MDA, y Vitamina C en los clúster. Las diferencias estadísticamente significativas se constatan para las concentraciones de AGE $t(16)=2.15$, $p=0.047$.

Para examinar la asociación entre los marcadores evaluados y las variables demográficas y clínicas, realizamos un análisis de regresión múltiple utilizando las variables demográficas y clínicas como dependientes y los biomarcadores adenosina, AGE, NOx, MDA y VitC como explicatorias. Con la variable edad de los pacientes, los resultados arrojan una bondad de ajuste del modelo ($F(5.25)=4.02$, $p<0.008$). La variabilidad explicada $R^2=0.44$. La variable cuyo coeficiente beta fue significativo fue la adenosina con ($B=-0.2309$, $t(25)=-2.20$, $p<0.03$), lo que significa que existe una correlación inversamente proporcional entre la edad y las concentraciones de adenosina. Con la variable NOx también se precisó una correlación inversamente proporcional ($B=-0.54$, $t(25)=-2.30620$, $p<0.02$). En tanto para la variable AGE, el valor del coeficiente fue ($B=0.787$, $t(25)=3.38360$, $p<0.002$), lo que plantea una correlación directamente proporcional.

Al analizar las variables clínicas relacionadas con la epileptogenicidad, demostramos que existió una correlación directamente proporcional entre la edad de inicio de las crisis y las concentraciones séricas de AGE. Los resultados arrojan una bondad de ajuste del modelo ($F(5.12)=2.22$, $p<0.118$). La variabilidad explicada $R^2=0.265$. El coeficiente beta de la variable AGE fue de ($B=0.843$ ($t(12)=2.52$, $p<0.02$).

Al evaluar la relación de los marcadores de adenosina y estrés oxidativo con las puntuaciones totales de la escala SUDEP - 7 no encontramos asociaciones significativas, lo cual puede atribuirse al comportamiento probabilístico de la variable SUDEP. Sin embargo, la prueba de hipótesis univariada t-test mostró una tendencia a concentraciones más altas de adenosina en los pacientes con alto riesgo de SUDEP, 126.81 vs 95.58 $t(16)=1.758$, $p=0.097$.

Discusión

El principal resultado de este estudio fue que los pacientes con EFR, tanto de origen temporal como extratemporal, se caracterizaron por un incremento de la toxicidad por estrés oxidativo, evaluadas mediante las concentraciones periféricas de MDA (indicador de daño oxidativo a biomoléculas) y AGE, así como de las defensas antioxidantes, evaluadas mediante la concentración de Vitamina C. Igualmente, el sistema de adenosina también mostró un incremento en relación con los controles. Se evidencia además una tendencia a concentraciones más altas de adenosina en los pacientes con alto riesgo de SUDEP. Es importante destacar que la mediana de SUDEP fue de 6, indicando un riesgo de SUDEP alto en los pacientes evaluados, lo cual es un comportamiento reportado en los pacientes con EFR.

Estos resultados indican que la EFR se caracteriza por cambios periféricos altamente específicos en la formación de aldehídos (niveles de MDA aumentados), así como en la oxidación de proteínas (AGE aumentado) y defensas antioxidantes también elevadas (especialmente Vitamina C). Se ha sugerido que el MDA solo o la relación toxicidad/antioxidante del estrés oxidativo podrían usarse como criterio de validación externo para el diagnóstico de EFR frente a controles sanos.

Los hallazgos de este trabajo resultan congruentes con los de un artículo anterior donde informamos niveles elevados de MDA en pacientes con ELT asociada a esclerosis del hipocampo.³⁹

Nuestros resultados son congruentes con múltiples estudios que han evidenciado diferentes marcadores sanguíneos de estrés oxidativo significativamente elevados en pacientes con epilepsia,^{40,41} en particular en pacientes con ELT.²¹ En el actual estudio se precisa que la toxicidad por estrés oxidativo se evidencia también en las epilepsias extratemporales, lo que le confiere una ampliación al marco de las EFR independientemente de la localización. Este resultado le confiere novedad a este trabajo, que se amplía al demostrar con el análisis de clúster realizado utilizando los indicadores de adenosina y estrés oxidativo, niveles mayores de estos marcadores en los

pacientes con ELT, en relación con las epilepsias extra-temporales, especialmente significativo para el AGE.

Diversos estudios han reportado que niveles elevados de MDA y 4-HNE indican un aumento de la peroxidación de lípidos y de la formación de aldehídos, así como de la oxidación de proteínas, según lo evaluado con carbonilos de proteínas. La peroxidación lipídica genera una gama de productos que pueden usarse como biomarcadores.^{42,43} De igual forma se han obtenido defensas antioxidantes bajas, incluyendo los grupos sulfhídrico, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión y vitamina E y C.^{39,44-46}

Los aldehídos reactivos, como el malondialdehído (MDA), pueden reaccionar fácilmente con las proteínas para formar productos finales de lipooxidación avanzada.⁴⁷ Los derivados carbonilo de los residuos de aminoácidos lisina, prolina, treonina y arginina pueden usarse como marcadores de oxidación de proteínas. Los productos avanzados de oxidación de proteínas (AOPP, por sus siglas en inglés) son marcadores establecidos de oxidación de proteínas. Del mismo modo, los productos finales de glicación avanzada (AGE) se forman por reacción de los grupos carbonilo de los carbohidratos con las proteínas.⁴⁸ Se ha postulado que la formación de MDA es una consecuencia de la peroxidación lipídica y la propagación de radicales peroxilo, y que la formación de peroxinitrito puede agravar la peroxidación lipídica y la formación de MDA, lo que explica la asociación inversa entre los niveles de NOx y de MDA reportada en algunos estudios.⁴⁹

Es importante destacar que el estrés oxidativo se reconoce tanto como causa, como consecuencia de las crisis epilépticas.²² En el tejido resecaado durante la cirugía de las EFR, se ha observado el daño inducido por las ERO a las biomoléculas, lo que sugiere la contribución del estrés oxidativo a la hiperexcitabilidad neuronal y la neurodegeneración.^{21,22} Las evidencias más sólidas de un vínculo causal entre el estrés oxidativo y la epilepsia lo constituyen las epilepsias genéticas causadas por mutaciones en el ADN mitocondrial que resultan en disfunción metabólica en las células nerviosas.⁶ Nuestro grupo ha investigado el impacto de la cirugía de la epilepsia en los marcadores séricos de daño oxidativo en pacientes con ELT farmacorresistente (Lorigados Pedre, 2018).³⁹ Antes de la cirugía, encontramos actividades aumentadas de SOD, CAT, marcadores de peroxidación lipídica y actividades disminuidas de GPx. Un hallazgo interesante que se replica en el presente trabajo fue la correlación positiva entre la duración de la enfermedad y los niveles de productos de proteínas de oxidación avanzada. Este resultado sugiere la presencia temprana de daño oxidativo a las proteínas en etapas iniciales de la enfermedad. Esto podría deberse a mecanismos de reparación de proteínas que no actúan tan eficientemente como en otras biomoléculas.

En modelos animales de ELT también se han mostrado indicadores de peroxidación lipídica y de formación de aldehídos, así como niveles reducidos de antioxidantes como la vitamina E y valores elevados de glutatión, superóxido dismutasa y catalasa.¹⁶⁻²⁰ Otro estudio realizado en modelo animal de epilepsia del lóbulo temporal, respalda la hipótesis

de que los cambios redox se correlacionan con la actividad convulsiva en las epilepsias adquiridas, independientemente de los insultos desencadenantes.¹⁵

Existen evidencias de que el aumento del estrés oxidativo, incluso en el hipocampo, aumenta la susceptibilidad a las crisis y que la activación periférica de las respuestas inmunoinflamatorias puede inducir estrés oxidativo en el hipocampo.⁴⁵ También hay alguna evidencia de que las respuestas inflamatorias y los mecanismos redox asociados pueden iniciar o aumentar las crisis y desempeñar un papel en la progresión de la enfermedad.^{50,51} En este sentido, es interesante señalar que la administración de pilocarpina y ácido kaínico en dos modelos animales de ELT,^{13,50} indujo elevación de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el hipocampo, en un ensayo utilizado para evaluar la producción de MDA.¹³ Se ha postulado entonces, que el aumento altamente específico en la formación periférica de MDA y AOPP puede contribuir a la epileptogénesis y a la esclerosis mesial del lóbulo temporal.

Medicación anticrisis y stress oxidativo

Algunos estudios han reportado efectos significativos de la MAC en los niveles de MDA, NOx y en los grupos de -SH.^{52,54} No identificamos efectos significativos de la MAC en los marcadores de estrés oxidativo y no encontramos asociación significativa entre el número de MAC utilizados por los pacientes y los marcadores evaluados. Un resultado novedoso de este trabajo fue la evaluación de los niveles sanguíneos de la MAC y su relación con los indicadores de estrés oxidativo. Asimismo, como el número y dosis de MAC utilizados no se relacionaron con las concentraciones de MDA, NOx, AGE y Vitamina C; los niveles sanguíneos de Carbamazepina, Lamotrigina, Fenitoína, Fenobarbital y Acido valproico utilizados por los pacientes con EFR, no mostraron relación estadísticamente significativa con la toxicidad del estrés oxidativo.

Estos resultados son congruentes con los hallazgos de Menon et al.⁵⁵ quienes no encontraron diferencias significativas en los niveles de MDA, carbonilos de proteínas y NOx entre sujetos en monoterapia y politerapia con MAC.⁵⁵ Estos autores también informaron niveles más altos de MDA y carbonilos de proteínas (sin cambios en NOx) en pacientes con epilepsia no tratados en relación con los controles, lo que sugiere que la MAC no induce el aumento de la toxicidad del estrés oxidativo. Además, no encontraron diferencias significativas en los niveles de MDA, carbonilos de proteínas y NOx entre los grupos de pacientes tratados con MAC y los no tratados,⁵⁵ lo que le permitió concluir que la MAC no afectaba esos tres biomarcadores. Finalmente, al igual que en nuestro estudio, Menon y colaboradores⁵⁵ no encontraron ningún efecto de la MAC individuales, a saber, carbamazepina, valproato y fenitoína en los biomarcadores. Otras investigaciones en esta área tampoco han encontrado diferencias en los biomarcadores oxidativos, incluidos los carbonilos, la peroxidación lipídica y las enzimas antioxidantes entre pacientes tratados y no tratados.^{54,56,57}

Adenosina y SUDEP en las epilepsias farmacorresistentes

Nuestro estudio reveló concentraciones de adenosina significativamente elevadas en el suero de pacientes con EFR en relación con los controles. Se precisó una tendencia de mayor concentración de adenosina en los pacientes con alto riesgo de SUDEP, cuando se compara con pacientes de menor riesgo.

Este resultado podría explicarse si asumimos el conocimiento de que la actividad neuronal excepcionalmente alta que caracteriza a las crisis epilépticas da como resultado un aumento de la adenosina extracelular a concentraciones muchas veces más altas que las que se observarían en condiciones normales y contribuye así a restringir la excitación excesiva, apelando al efecto modulador inhibitorio de la excitabilidad neuronal.³¹ Los niveles extracelulares de adenosina dependen en gran medida de un ciclo de adenosina basado en astrocitos, que comprende la liberación de ATP, la rápida degradación de ATP en adenosina y la recaptación metabólica de la adenosina a través de transportadores de nucleósidos equilibrantes y la fosforilación por la enzima adenosina quinasa (ADK), regulador clave de la adenosina, que cataliza el metabolismo de la adenosina a 5'-adenosina monofosfato.⁵⁸

Evidencias convincentes demuestran que las purinas, ATP y adenosina, son mediadores claves del proceso epileptogénico. Las concentraciones extracelulares de ATP aumentan drásticamente en condiciones patológicas, donde funciona como ligando en una serie de receptores purinérgicos. El ATP y la adenosina han asumido funciones en gran medida opuestas al acoplar la excitabilidad neuronal con la homeostasis energética en el cerebro.⁵⁹ Se considera que la adenosina, como anticonvulsivo endógeno del cerebro, es responsable de la detención de las crisis y de la refractariedad postictal. Se ha demostrado además que la disfunción del sistema adenosinérgico contribuye a la epileptogénesis.⁶⁰

La actividad ictal produce grandes cantidades de adenosina, y es este aumento de adenosina inducido por las crisis lo que normalmente detiene la crisis.²⁴ Este efecto está mediado por el receptor acoplado a la proteína A1 G de la adenosina. La función neuromoduladora de la adenosina se basa en una activación equilibrada de los receptores inhibidores A(1) (A1R) y los receptores facilitadores A(2A) (A2AR), que en su mayoría controlan las sinapsis glutamatérgicas excitatorias: A1R impone un freno tónico en la transmisión excitatoria, mientras que A2AR se dedica selectivamente a promover fenómenos de plasticidad sináptica.⁶¹

Existen evidencias de que la activación de los receptores A1 disminuye la actividad convulsiva en modelos animales, incluidos los modelos de epilepsia resistente a los medicamentos. Asimismo, los avances recientes han aumentado nuestra comprensión de las comorbilidades de la epilepsia, destacando el potencial de los receptores de adenosina para modular las comorbilidades asociadas con la epilepsia, incluida la disfunción cardiovascular, el sueño y la cognición.⁶² En relación con la hipótesis adenosina y SUDEP explorada, en este trabajo no se encontró relación entre las concentraciones

de adenosina y la estratificación del riesgo de SUDEP, lo cual atribuimos a la variabilidad de este indicador en los pacientes con EFR evaluados, donde la mayoría presentan alto riesgo de SUDEP. Se ha encontrado en tejido resecado de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal asociada a esclerosis del hipocampo sometidos a cirugía de epilepsia, un marcaje menor del receptor astrogial de adenosina A2A en la corteza temporal en el grupo con mayor riesgo de SUDEP, lo que sugiere alteración de la modulación de la adenosina.²⁷ De particular relevancia resulta que la estimulación de la amígdala, media la apnea en las crisis epilépticas. Un estudio reciente reportó aumento del receptor A1R neuronal en la amígdala en el grupo con mayor riesgo de SUDEP.³² La hipótesis de la adenosina en la SUDEP propone que la estimulación de la adenosina o la señalización excesiva en el período postictal, media la depresión del despertar y la respiración en pacientes con epilepsia.³¹ Los efectos adversos de la señalización de adenosina pueden potenciar un resultado mortal en forma de SUDEP al suprimir la respiración y la excitación en el período postictal. La evidencia de modelos animales sugiere que la señalización excesiva de adenosina postictal contribuye a la fisiopatología de SUDEP.³¹ Tal como se ha planteado, el sistema de adenosina está desregulado en las epilepsias, y los cambios mal adaptativos en el metabolismo de la adenosina podrían explicar la epileptogenicidad, la epileptogénesis, así como las comorbilidades y complicaciones de la enfermedad, como la SUDEP.

Conclusiones

1. En pacientes con epilepsia farmacorresistente, tanto temporal como extratemporal, existen perfiles incrementados de adenosina y de toxicidad por estrés oxidativo. Este incremento resulta más relevante en los pacientes con epilepsia del lóbulo temporal.
2. Los perfiles incrementados de adenosina y de toxicidad por estrés oxidativo en pacientes con epilepsia farmacorresistente se relacionan con la epileptogenicidad y resultan independientes de la medicación anticrisis.
3. En los pacientes con epilepsia farmacorresistente con alto riesgo de muerte súbita existe una tendencia al aumento de la concentración de adenosina, lo que sustenta la hipótesis de esta en la fisiopatología de la SUDEP.

Bibliografía

1. Beghi E. The Epidemiology of Epilepsy. *Neuroepidemiology*. 2020;54(2):185-91. doi:10.1159/000503831. Epub 2019 Dec 18.
2. Morales Chacón LM, García Maeso I, Baez Martín MM, Bender Del Busto JE, García Navarro ME, Quintanal Cordero N, et al. Long-Term Electroclinical and Employment Follow up in Temporal Lobe Epilepsy Surgery. A Cuban Comprehensive Epilepsy Surgery Program. *Behav Sci (Basel)*. 2018;8(2):19. doi:0.3390/bs8020019.

3. Brodie MJ. Diagnosing and predicting refractory epilepsy. *Acta Neurol Scand Suppl.* 2005;181:36-9. doi:10.1111/j.600-0404.2005.00507.x.
4. Morales Chacón LM, González González J, Ríos Castillo M, Berrillo Batista S, Batista García-Ramo K, Santos Santos A, et al. Surgical Outcome in Extratemporal Epilepsies Based on Multimodal Pre-Surgical Evaluation and Sequential Intraoperative Electrographic. *Behav Sci (Basel).* 2021;11(3):30 doi:10.3390/bs11030030.
5. Alqarni F, Eweis HS, Ali A, Alrafiah A, Alsieni M, Karim S, et al. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biomedicines.* 2022;10(1):168 doi:10.3390/biomedicines10010168.
6. Aguiar CC, Almeida AB, Araújo PV, de Abreu RN, Chaves EM, do Vale OC, et al. Oxidative stress and epilepsy: literature review. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:795259. doi:10.1155/2012/795259.
7. Lorigados Pedre L, Morales Chacón LM, Orozco Suárez S, Pavón Fuentes N, Estupiñán Díaz B, Serrano Sánchez T, et al. Inflammatory mediators in epilepsy. *Curr Pharm Des.* 2013;19(38):6766-72. doi: 10.2174/1381612811319380009.
8. Vishnoi S, Raisuddin S, Parvez S. Glutamate Excitotoxicity and Oxidative Stress in Epilepsy: Modulatory Role of Melatonin. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2016;35(4):365-74. doi:10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2016016399.
9. Ambrogini P, Torquato P, Bartolini D, Albertini MC, Lattanzi D, Di Palma M, et al. Excitotoxicity, neuroinflammation and oxidant stress as molecular bases of epileptogenesis and epilepsy-derived neurodegeneration: The role of vitamin E. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019;1865(6):1098-112. doi: 10.16/j.bbadis.2019.01.026.
10. Fabisiak T, Patel M. Crosstalk between neuroinflammation and oxidative stress in epilepsy. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:976953. doi:10.3389/fcell.2022.976953. eCollection 2022.
11. Chen TS, Lai MC, Huang HI, Wu SN, Huang CW. Immunity, Ion Channels and Epilepsy. *Int J Mol Sci.* 2022;23(12):6446. doi:10.3390/ijms23126446.
12. Lu W, Wu Z, Zhang C, Gao T, Ling X, Xu M, et al. The Interconnected Mechanisms of Oxidative Stress and Neuroinflammation in Epilepsy. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2022;2022:7792791. doi:10.1155/2022/7792791. eCollection 2022.
13. Dal-Pizzol F, Klamt F, Vianna MM, Schröder N, Quevedo J, Benfato MS, et al. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neurosci Lett.* 2000;291(3):179-82. doi: 10.1016/s0304-3940(00)01409-9.
14. Rosendahl S, Anturaniemi J, Kukko-Lukjanov TK, Vuori KA, Moore R, Hemida M, et al. Increased Superoxide Dismutase 2 by Allopregnanolone Ameliorates ROS-Mediated Neuronal Death in Mice with Pilocarpine-Induced Status Epilepticus. *J Vet Intern Med.* 2023;37(3):1100-10. doi: 10.11/jvim.16698.
15. Bhuyan P, Patel DC, Wilcox KS, Patel M. Oxidative stress in murine Theiler's virus-induced temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol.* 2015;271:329-34. doi:10.1016/j.expneurol.2015.06.012. Epub Jun 14.
16. Shakeel S, Rehman MU, Tabassum N, Amin U, Mir MUR. SIRT5 Deficiency Enhances Susceptibility to Kainate-Induced Seizures and Exacerbates Hippocampal Neurodegeneration not through Mitochondrial Antioxidant Enzyme SOD2. *Pharmacogn Mag.* 2017;13(Suppl 1):S154-S60. doi:10.4103/0973-1296.203977. Epub 2017 Apr 7.
17. Kiasalari Z, Khalili M, Shafiee S, Roghani M. The effect of Vitamin E on learning and memory deficits in intrahippocampal kainate-induced temporal lobe epilepsy in rats. *Indian J Pharmacol.* 2016;48(1):11-4. doi: 0.4103/0253-7613.174394.
18. Khamse S, Sadr SS, Roghani M, Hasanzadeh G, Mohammadian M. Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: Underlying mechanisms. *Pharm Biol.* 2015;53(12):1818-25. doi:10.3109/13880209.2015.1010738. Epub 2015 Apr 15.
19. Dariani S, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Thymoquinone attenuates astrogliosis, neurodegeneration, mossy fiber sprouting, and oxidative stress in a model of temporal lobe epilepsy. *J Mol Neurosci.* 2013;51(3):679-86. doi:10.1007/s12031-013-0043-3. Epub 2013 Jun 23.
20. Peternel S, Pilipović K, Zupan G. Seizure susceptibility and the brain regional sensitivity to oxidative stress in male and female rats in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009;33(3):456-62. doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.01.005. Epub Jan 21.
21. Pearson-Smith JN, Patel M. Metabolic Dysfunction and Oxidative Stress in Epilepsy. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11):2365. doi:10.3390/ijms18112365.
22. Patel M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(12):1951-62. doi:10.016/j.freeradbiomed.2004.08.021.
23. Hong H, Lu X, Wu C, Chen J, Chen C, Zhang J, et al. Adenosine dysfunction in epilepsy. *Front Pharmacol.* 2022;13:898955. doi:10.3389/fphar.2022.898955. eCollection 2022.
24. Tescarollo FC, Rombo DM, DeLiberto LK, Fedele DE, Alharfoush E, Tomé À R, et al. Role of Adenosine in Epilepsy and Seizures. *J Caffeine Adenosine Res.* 2020;10(2):45-60. doi:10.1089/caff.2019.0022. Epub 2020 Jun 4.
25. Ashraf O, Huynh T, Purnell BS, Murugan M, Fedele DE, Chitravanshi V, et al. Reducing the Risk of Sudden Unexpected Death in Epilepsy (SUDEP). *Neuropharm.*

- 2021;184:108405.
doi:10.1016/j.neuropharm.2020.108405. Epub 2020 Nov 16.
26. Tescarollo FC, Rombo DM, DeLiberto LK, Fedele DE, Alharfoush E, Tomé ÂR, et al. Role of Adenosine in Epilepsy and Seizures. *J Neurophysiol.* 2016;115(5):2286-93. doi:10.1152/jn.00011.2016. Epub 2016 Feb 17.
 27. Patodia S, Paradiso B, Garcia M, Ellis M, Diehl B, Thom M, et al. Adenosine kinase and adenosine receptors A(1) R and A(2A) R in temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis and association with risk factors for SUDEP. *Epilepsia.* 2020;61(4):787-97. doi: 10.1111/epi.16487. Epub 2020 Apr 3.
 28. King-Stephens D. Biomarkers for SUDEP: Are We There Yet? *Front Neurosci.* 2021;15:708304. doi:10.3389/fnins.2021.708304. eCollection 2021.
 29. Zhao H, Long L, Xiao B. Advances in sudden unexpected death in epilepsy. *Acta Neurol Scand.* 2022;146(6):716-22. doi: 10.1111/ane.13715. Epub 2022 Nov 10.
 30. Tupal S, Faingold CL. Evidence supporting a role of serotonin in modulation of sudden death induced by seizures in DBA/2 mice. *Epilepsia.* 2006;47(1):21-6. doi:10.1111/j.528-67.2006.00365.x.
 31. Purnell B, Murugan M, Jani R, Boison D. The Good, the Bad, and the Deadly: Adenosinergic Mechanisms Underlying Sudden Unexpected Death in Epilepsy. *Neuron.* 2014;83(5):996-8. doi:10.1016/j.neuron.2014.08.026.
 32. Patodia S, Paradiso B, Ellis M, Somani A, Sisodiya SM, Devinsky O, et al. Characterisation of medullary astrocytic populations in respiratory nuclei and alterations in sudden unexpected death in epilepsy. *Epilepsy Res.* 2019;157:106213. doi:10.1016/j.eplepsyres.2019.106213. Epub 2019 Oct 1.
 33. Boison D. Adenosine and epilepsy: from therapeutic rationale to new therapeutic strategies. *Neuroscientist.* 2005;11(1):25-36. doi:10.1177/1073858404269112.
 34. Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(3):247-64. doi:10.1038/nrd983.
 35. Wade CR, van Rij AM. Plasma thiobarbituric acid reactivity: reaction conditions and the role of iron, antioxidants and lipid peroxy radicals on the quantitation of plasma lipid peroxides. *Life Sci.* 1988;43(13):1085-93. doi:10.16/0024-3205(88)90204-4.
 36. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126(1):131-8. doi:10.1016/0003-2697(82)90118-x.
 37. Henle T, Deppisch R, Beck W, Hergesell O, Hänsch GM, Ritz E. Advanced glycated end-products (AGE) during haemodialysis treatment: discrepant results with different methodologies reflecting the heterogeneity of AGE compounds. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14(8):1968-75. doi:10.093/ndt/14.8.
 38. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem.* 1999;269(2):337-41. doi: 10.1006/abio.999.4019.
 39. Lorigados Pedre L, Gallardo JM, Morales Chacón LM, Vega García A, Flores-Mendoza M, Neri-Gómez T, et al. Oxidative Stress in Patients with Drug Resistant Partial Complex Seizure. *Behav Sci (Basel).* 2018;8(6):59. doi:10.3390/bs8060059.
 40. Chuang YC. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in seizure-induced neuronal cell death. *Acta Neurol Taiwan.* 2010;19(1):3-15.
 41. Akünal Türel C, Yunusoğlu O. Mitochondrial diseases and status epilepticus. *Int J Environ Health Res.* 2023;33(5):529-40. doi:10.1080/09603123.2023.2167947.
 42. Palmieri B, Sblendorio V. Oxidative stress tests: overview on reliability and use. Part II. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2007;11(6):383-99.
 43. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res.* 2004;43(3):200-27. doi:10.1016/j.plipres.2003.10.001.
 44. López J, González ME, Lorigados L, Morales L, Riverón G, Bauzá JY. Oxidative stress markers in surgically treated patients with refractory epilepsy. *Clin Biochem.* 2007;40(5-6):292-8. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2006.11.019. Epub 7 Jan 5.
 45. Ho YH, Lin YT, Wu CW, Chao YM, Chang AY, Chan JY. Peripheral inflammation increases seizure susceptibility via the induction of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus. *J Biomed Sci.* 2015;22(1):46. doi:10.1186/s12929-015-0157-8.
 46. Ben-Menachem E, Kyllerman M, Marklund S. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies. *Epilepsy Res.* 2000;40(1):33-9. doi:10.1016/s0920-1211(00)00096-6.
 47. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438. doi:10.1155/2014/360438. Epub 2014 May 8.
 48. Münch G, Keis R, Wessels A, Riederer P, Bahner U, Heidland A, et al. Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1997;35(9):669-77. doi:10.1515/cclm.997.35.9.669.
 49. Maes M, Landucci Bonifacio K, Morelli NR, Vargas HO, Barbosa DS, Carvalho AF, et al. Major Differences in Neurooxidative and Neuronitrosative Stress Pathways Between Major Depressive Disorder and Types I and II Bipolar Disorder. *Mol Neurobiol.* 2019;56(1):141-56. doi:10.1007/s12035-018-1051-7. Epub 2018 Apr 21.
 50. Rowley S, Liang LP, Fulton R, Shimizu T, Day B, Patel M. Mitochondrial respiration deficits driven by reactive

- oxygen species in experimental temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2015;75:151-8. doi:10.1016/j.nbd.2014.12.025. Epub 5 Jan 17.
51. Thom M. Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014;40(5):520-43. doi:10.1111/nan.12150.
 52. Hamed SA, Abdellah MM, El-Melegy N. Blood levels of trace elements, electrolytes, and oxidative stress/antioxidant systems in epileptic patients. *J Pharmacol Sci.* 2004;96(4):465-73. doi:10.1254/jphs.fpj04032x. Epub 2004 Dec 10.
 53. Peker E, Oktar S, Ari M, Kozan R, Doğan M, Cağan E, et al. Nitric oxide, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme levels in epileptic children using valproic acid. *Brain Res.* 2009;1297:194-7. doi:10.1016/j.brainres.2009.08.048. Epub Aug 21.
 54. Arhan E, Kurt ANC, Neselioglu S, Yerel O, Uçar HK, Aydin K, et al. Effects of antiepileptic drugs on dynamic thiol/disulphide homeostasis in children with idiopathic epilepsy. *Seizure.* 2019;65:89-93. doi:10.1016/j.seizure.2018.12.019. Epub Dec 26.
 55. Menon B, Ramalingam K, Kumar RV. Oxidative stress in patients with epilepsy is independent of antiepileptic drugs. *Seizure.* 2012;21(10):780-4. doi: 10.1016/j.seizure.2012.09.003. Epub Sep 30.
 56. Liu CS, Wu HM, Kao SH, Wei YH. Phenytoin-mediated oxidative stress in serum of female epileptics: a possible pathogenesis in the fetal hydantoin syndrome. *Hum Exp Toxicol.* 1997;16(3):177-81. doi: 10.1177/096032719701600308.
 57. Maes M, Supasitthumrong T, Limotai C, Michelin AP, Matsumoto AK, de Oliveira Semão L, et al. Increased Oxidative Stress Toxicity and Lowered Antioxidant Defenses in Temporal Lobe Epilepsy and Mesial Temporal Sclerosis: Associations with Psychiatric Comorbidities. *Mol Neurobiol.* 2020;57(8):3334-48. doi: 10.1007/s12035-020-01949-8. Epub 2020 Jun 9.
 58. Weltha L, Reemmer J, Boison D. The role of adenosine in epilepsy. *Brain Res Bull.* 2019;151:46-54. doi:10.1016/j.brainresbull.2018.11.008. Epub Nov 20.
 59. Beamer E, Kuchukulla M, Boison D, Engel T. ATP and adenosine-Two players in the control of seizures and epilepsy development. *Prog Neurobiol.* 2021;204:102105 doi:10.1016/j.pneurobio.2021.102105. Epub 2021 Jun 16.
 60. Pignataro G, Simon RP, Boison D. Transgenic overexpression of adenosine kinase aggravates cell death in ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27(1):1-5. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600334. Epub 2006 May 10.
 61. Cunha RA. Adenosine A1 and A2A Receptors in the Brain: Current Research and Their Role in Neurodegeneration. *J Neurochem.* 2016;139(6):1019-55. doi:10.1111/jnc.13724. Epub 2016 Aug 16.
 62. Baltos JA, Casillas-Espinosa PM, Rollo B, Gregory KJ, White PJ, Christopoulos A, et al. The role of the adenosine system in epilepsy and its comorbidities. *Br J Pharmacol.* 2023;19(10):16094.