



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS

Facultad de Medicina
Instituto de Neurociencias de Castilla y León

Estudio del mecanismo de acción de la Estimulación del Nervio Vago en el hámster GASH/Sal.

- TESIS DOCTORAL -

Autor:
Jaime Gonçalves Sánchez

Directoras:
Dra. Consuelo Sancho Sánchez
Dra. M^a Dolores Estilita López García

Salamanca, 2023

Dedicado a María José



La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la obtención de un contrato de investigación predoctoral financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (FPU 18/04070). Trabajo subvencionado a través de proyectos concedidos por la Gerencia Regional de Salud de Castilla y León (GRS 1660/A/17, 1838/A/18, 2060/A/19, 2158/A/20, 2382/A/21), por la Fundación General de la Universidad de Salamanca (TCUE 2018-2020) y la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (USP/USAL FAPESP SPRINT 2019/16574-2).

Agradecimientos

Este trabajo está especialmente dedicado a mi madre, la profesora y neurocirujana María José Sánchez Ledesma, y no sólo porque sea mi madre, lo cual ya sería un motivo mucho más que suficiente como para dedicarle la tesis doctoral, sino porque fue quién tuvo la idea de desarrollar esta línea de investigación y, junto con las directoras de tesis, es la responsable de que mi trabajo se centrara en este tema. Además, era con quién compartía y debatía los resultados del día a día, y me enseñó cosas tan básicas para este trabajo como dar puntos de sutura o qué es un neuroestimulador. Proponía ideas continuamente y era la persona de nuestro grupo que más conocimientos tenía sobre el tema de investigación. Tuvo la mala fortuna de desarrollar un cáncer que le ha impedido seguir con nosotros. Era tan fuerte y luchadora, que ni durante su enfermedad dejó de ser clave en el trabajo de investigación. Para mí, ha sido una suerte haber tenido ese ejemplo en casa, haber podido trabajar directamente con ella y haber aprendido tantas cosas. Sé que, si no se hubiera ido tan pronto, esta tesis habría sido mucho más completa. La he echado en falta desde el momento en que falleció, no sólo en casa, sino también muchísimo en el plano académico. Es un honor que el grueso de horas de trabajo de esta tesis se haya llevado a cabo en un laboratorio que lleva su nombre. Es un orgullo que haya muchas personas que se sigan acordando de ella por su calidad humana. No puedo hacer menos que dedicarle este trabajo.

Dicho esto, debo agradecer a mis directoras de tesis su trabajo. A Consuelo por su supervisión y aporte de nuevas ideas, y a Lita por su gestión del grupo y evitar la dispersión y que iniciara tropecientas líneas de investigación diferentes sin acabar las anteriores.

Quiero agradecer a mi padre, profesor y neurocirujano, por quedarse al frente del barco cuando las cosas se torcieron, y porque ha sido clave en la puesta a punto de la cirugía de implantación de los neuroestimuladores descrita en la tesis, paso sin el cual los experimentos no habrían sido posibles.

Agradezco a todos en la Facultad de Medicina, por tratarme como en casa durante estos años. Doy especialmente las gracias a Daniel, porque le he mareado con pequeños encargos y favores durante toda la tesis. También le doy las gracias a Begoña, por echarme una mano y enseñarme algunas de las técnicas de laboratorio mencionadas en la tesis. Debo mencionar a los compañeros de histología porque cuando he necesitado algo, me han ayudado sin dudarlos. Agradezco también a Javier como Decano por permitirme continuar con los experimentos con animales durante la complicada situación de la pandemia. También agradezco a los estudiantes que han pasado de forma breve por el laboratorio y que me han echado una mano mientras aprendían.

Gracias a los compañeros del laboratorio 12 del Instituto de Neurociencias por su colaboración. A todos. Especialmente a Orlando, por su labor de coordinación cuando aparecieron innumerables inconvenientes con los pedidos de electrodos en la aduana y

por su gestión de los proyectos TCUE. También debo destacar su ayuda y la de Nacho para llevar a cabo los estudios de inmunohistoquímica. Gracias también a Giselda por echarme una mano con el estudio de los marcadores inflamatorios.

Tengo que dar las gracias al laboratorio de neurofisiología y neuroetología experimental de la Facultad de Medicina de Ribeirão Preto, por haber hecho posible la realización de los registros electrofisiológicos. Agradecimiento especial en este sentido a Gabriel y a Flavio, dado que, sin su colaboración y conocimientos, habría sido imposible.

Gracias a Livanova por ceder los primeros sistemas de estimulación del nervio vago utilizados en la puesta a punto de la técnica y al grupo BISITE por el desarrollo y revisión de los neuroestimuladores que se emplearon posteriormente.

Por último, y no por ello menos importante, gracias a mi familia y amigos, por aguantarme fuera del laboratorio. También se lo dedico a mi abuelo, porque, aunque hace ya años que falleció, fue muy importante en mi educación.

Índice

Abreviaturas	8
Lista de figuras y tablas	11
1. Introducción. Estado actual del tema	13
1.1. La epilepsia	13
1.2. Tratamiento de la epilepsia	15
1.2.1. <i>Fármacos antiepilépticos</i>	15
1.2.2. <i>Cirugía de la epilepsia</i>	17
1.2.3. <i>Estimulación del nervio vago</i>	20
1.2.3.1. Desarrollo de la VNS. Efectividad clínica en epilepsia	21
1.2.3.2. Uso en otras patologías	23
1.2.3.3. Mecanismo de acción	25
1.3. Investigación en modelos animales	28
1.3.1. <i>Modelos animales de epilepsia y crisis epilépticas</i>	28
1.3.1.1. El hámster GASH/Sal	31
1.3.2. <i>Modelos animales de estimulación del nervio vago en epilepsia</i>	34
2. Justificación del trabajo	35
3.1 Hipótesis	37
3.2 Objetivos	37
4 Diseño experimental	38
5.1 Animales de experimentación	39
5.2 Sistemas de estimulación del nervio vago y parámetros utilizados	40
5.3 Protocolo quirúrgico	41
5.4 Fármacos antiepilépticos	43
5.4.1 <i>Dosis y administración</i>	43
5.4.2 <i>Evaluación de los niveles de fármacos en sangre</i>	44
5.5 Estímulo acústico. Registro de las crisis convulsivas	44
5.6 Estudio neuroetológico de las crisis convulsivas	45
5.7 Evaluación de los cambios comportamentales	48
5.8 Evaluación del estado general	48
5.9 Registros electroneurofisiológicos	49
5.10 Extracción y procesamiento de muestras	51
5.10.1 <i>Extracción y procesamiento de las muestras sanguíneas</i>	51
5.10.2 <i>Extracción y procesamiento de tejido nervioso</i>	51
5.11 Estudio de la expresión de marcadores inflamatorios	52
5.11.1 <i>ELISA</i>	52
5.11.2 <i>Matrices de marcadores inflamatorios</i>	52

5.12	Estudios histológicos	53
5.12.1	<i>Tinción de hematoxilina-eosina</i>	53
5.12.2	<i>Inmunohistoquímica</i>	53
5.13	Análisis estadístico	54
6	Resultados	55
6.1	Efectos de la VNS sobre las crisis convulsivas	55
6.2	Efectos de la rVNS sobre las crisis convulsivas	57
6.3	Niveles de fármacos en sangre	58
6.4	Efectos de los FAE sobre las crisis convulsivas	59
6.4.1	<i>Fenobarbital</i>	59
6.4.2	<i>Lamotrigina</i>	59
6.4.3	<i>Levetiracetam</i>	60
6.4.4	<i>Ácido valproico</i>	60
6.5	Estudio neuroetológico	65
6.5.1	<i>Etogramas grupo SHAM</i>	65
6.5.2	<i>Etogramas grupo VNS</i>	66
6.5.3	<i>Etogramas grupo rVNS</i>	68
6.5.4	<i>Etogramas grupos PB</i>	70
6.5.5	<i>Etogramas grupos LTG</i>	72
6.5.6	<i>Etogramas grupos LEV</i>	75
6.5.7	<i>Etogramas grupos VPA</i>	77
6.6	Efectos sobre el comportamiento de VNS y FAE: prueba de campo abierto	80
6.7	Evaluación del estado general	85
6.8	Registros electroneurofisiológicos	87
6.9	Expresión de marcadores inflamatorios	89
6.9.1	<i>ELISA</i>	89
6.9.2	<i>Matrices de marcadores inflamatorios</i>	90
6.10	Estudio inmunohistoquímico de la expresión de c-Fos	94
7	Discusión	96
7.1	Discusión metodológica	96
7.2	El hámster GASH/Sal como modelo para el estudio de la VNS.	100
7.3	Sistema de estimulación del nervio vago de fabricación propia vs sistema comercial	101
7.4	Estimulación del nervio vago izquierdo vs derecho	103
7.5	Sinergia con fármacos antiepilépticos	106
7.6	Mecanismos de acción de la VNS: efecto antiinflamatorio	108
7.7	Mecanismos de acción: efecto sobre la actividad neuronal.	111

8	Conclusiones	116
9	Bibliografía	117
10	Anexos	134
	ANEXO I. Protocolo de hematoxilina-eosina	134
	ANEXO II. Protocolo de inmunohistoquímica para c-Fos	134
	ANEXO III. Artículo de investigación publicado	135

Abreviaturas

μL	Microlitros
μm	Micrómetros
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AP	Área postrema
ARN	Ácido ribonucleico
Cacnb4	Subunidad auxiliar β-4 del canal de calcio dependiente de voltaje
CAP	Vía colinérgica antiinflamatoria
CCR5	Receptor 5 de quimiocina cisteína-cisteína
CI	Colículo inferior
cm	Centímetros
cNTS	Porción caudal del núcleo del tracto solitario
cSI	Índice de severidad categorizado
DAB	Diaminobencidina
dB SPL	Decibelios
DBA	Dilute brown agouti coat color mouse
DBS	Estimulación cerebral profunda
DE50	Dosis efectiva media
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMV	Núcleo motor dorsal del vago
DR	Núcleo dorsal del rafe
EA	Estimulación acústica
EDTA	Ácido etilendiaminatetraacético
EEG	Electroencefalograma
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
eTNS	Estimulación del nervio trigémino
FAE	Fármaco antiepiléptico
FasL	Ligando de Fas
FCS	Suero fetal bovino
Fepi	Pollo epiléptico Fayoumi
fMRI	Resonancia magnética funcional
g	Gramos
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GAERS	Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg
GASH/Sal	Genetic Audiogenic Seizures Hamster/Salamanca
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GEPRs	Genetically epilepsy-prone rat
GPG:Vall	Gómez–Palomo–Gómez, Valladolid
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HPLC/MS	Cromatografía líquida de alto rendimiento/espectrometría de masas
Hz	Hercios
IFN	Interferón
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IL	Interleucina
ILAE	Liga Internacional contra la Epilepsia

KA	Ácido kaínico
KC	Citocina derivada de los queratinocitos
KCC2	Cotransportador potasio-cloruro 2
KCl	Cloruro de potasio
KCNQ2-5	Miembros 2-5 de la subfamilia Q de canales de potasio dependientes de voltaje
KF	Núcleo de Kölliker-Fuse
kg	Kilogramos
kHz	Kilohercios
KM	Kurshinsky-Molodkina rat
L	Litros
LC	Locus coeruleus
LEV	Levetiracetam
LFP	Potencial de campo local
LIX	Quimiocina inducida por lipopolisacárido
LMEP	Potenciales evocados motores laríngeos
LPB	Núcleo parabraquial lateral
LTG	Lamotrigina
M	Molar
mA	Miliamperios
mAh	Miliamperio hora
MCP-1 // CCL2	Proteína quimioatrayente de monocitos 1 // ligando 2 de quimiocina (cisteína-cisteína)
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MES	Electroshock máximo
Mg	Miligramos
min	Minuto
MIP1-α // CCL3	Proteína inflamatoria de los macrófagos 1- α // ligando 3 de quimiocina (cisteína-cisteína)
Mm	Milímetros
MMP	Metaloproteinasa de la matriz extracelular
MPB	Núcleo parabraquial medial
NaCl	Cloruro de sodio
NAHCO3	Bicarbonato de sodio
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico
NTS	Núcleo del tracto solitario
°C	Grados centígrados
PB	Fenobarbital
PBN	Núcleo parabraquial
PCs	Células de Purkinje
PDA	Asistente digital personal
PET FDG	Tomografía por Emisión de Positrones con Fluorodesoxiglucosa
pg	Picogramos
pH	Potencial de hidrógeno
PILO	Pilocarpina
PMDS	Polidimetilsiloxano
PPARα	Receptores activados por proliferadores peroxisómicos α

ppm	Partes por millón
PTZ	Pentilenotetrazol
RAGE	Receptor para los compuestos de glicosilación avanzada
RD	Real Decreto
RNS	Estimulación de respuesta
rpm	Revoluciones por minuto
rVNS	Estimulación vagal derecha
SDF	Factor derivado de células estromales
sDI	Índice de sedación
SV2A	Glicoproteína 2A de la vesícula sináptica
TARC	Quimiocina reguladora de la actividad del timo
TBS	Solución salina tamponada con Tris
tDCS	Estimulación transcraneal por corriente directa
TGF	Factor de crecimiento transformante
TMS	Estimulación magnética transcraneal
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TUS	Estimulación transcraneal con ultrasonidos
tVNS	Estimulación vagal transcutánea
Tx	Tritón
V	Voltios
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
Vglut	Transportador vesicular de glutamato
VNS	Estimulación del nervio vago
VPA	Ácido valproico
WAG/Rij	Wistar albino glaxo/rijwik
WAR	Wistar audiogenic rat
X	X par craneal (Nervio vago)

Lista de figuras y tablas

Número	Título	Página
Figura 1	Tipos de crisis epilépticas según la ILAE	14
Figura 2	Tipos de epilepsia según la ILAE	15
Figura 3	Fármacos antiepilépticos (FAE) introducidos en el mercado hasta el año 2020	16
Figura 4	El nervio vago y la VNS	26
Figura 5	Reflejo inflamatorio mediado por el nervio vago	28
Figura 6	Clasificación de los modelos de epilepsia y crisis epilépticas	31
Figura 7	Esquema de las áreas cerebrales más importantes en la génesis de las crisis reflejas audiógenas y comportamientos asociados	34
Figura 8	Esquema general del diseño experimental	38
Figura 9	Fotografías de los sistemas de VNS utilizados	41
Figura 10	Cirugía de implantación de los sistemas de VNS	43
Figura 11	Sistema de registro de las crisis convulsivas	45
Figura 12	Funcionamiento del software Ethomatic.	46
Figura 13	Prueba de campo abierto	48
Figura 14	Registros electrofisiológicos en el GASH/Sal	50
Figura 15	Efecto anticonvulsivo de la VNS. Comparativa entre los dos neuroestimuladores utilizados	55
Figura 16	Efecto anticonvulsivo de la VNS	56
Figura 17	Efecto de la VNS sobre las convulsiones tónico-clónicas	56
Figura 18	Efecto de la VNS sobre la carrera salvaje	57
Figura 19	Comparativa del efecto anticonvulsivo de la VNS y la rVNS	57
Figura 20	Comparativa de los efectos de la VNS y la rVNS sobre la carrera salvaje y las convulsiones tónico-clónicas	58
Figura 21	Curva de niveles de los fármacos en sangre administrados de forma aislada y en combinación con VNS	59
Figura 22	Comparativa del efecto anticonvulsivo del PB, la VNS y el tratamiento combinado con VNS+PB	61
Figura 23	Comparativa del efecto anticonvulsivo de la LTG, la VNS y el tratamiento combinado con VNS+LTG	62
Figura 24	Comparativa del efecto anticonvulsivo del LEV, la VNS y el tratamiento combinado con VNS+LEV	63
Figura 25	Comparativa del efecto anticonvulsivo del VPA, la VNS y el tratamiento combinado con VNS+VPA	64
Figura 26	Etogramas correspondientes al grupo SHAM	65
Figura 27	Etogramas correspondientes al grupo VNS	67
Figura 28	Etogramas correspondientes al grupo rVNS	69
Figura 29	Etogramas correspondientes al grupo PB	70
Figura 30	Etogramas correspondientes al grupo VNS+PB	71
Figura 31	Etogramas correspondientes al grupo LTG	73

Figura 32	Etogramas correspondientes al grupo VNS+LTG	74
Figura 33	Etogramas correspondientes al grupo LEV	75
Figura 34	Etogramas correspondientes al grupo VNS+LEV	76
Figura 35	Etogramas correspondientes al grupo VPA	78
Figura 36	Etogramas correspondientes al grupo VNS+VPA	79
Figura 37	Distancia recorrida en las pruebas de campo abierto	80
Figura 38	Tiempo de inmovilización en las pruebas de campo abierto	81
Figura 39	Elevaciones en las pruebas de campo abierto	82
Figura 40	Acicalamiento en las pruebas de campo abierto	83
Figura 41	Entradas a la zona central en las pruebas de campo abierto	84
Figura 42	Tiempo en la zona central en las pruebas de campo abierto	84
Figura 43	Cambios en el peso a lo largo del tratamiento	86
Figura 44	Registros electrofisiológicos del nervio vago (X) durante el protocolo de VNS	88
Figura 45	Nervio vago cervical del hámster GASH/Sal.	88
Figura 46	Niveles de IL-1 β en tronco encefálico, corteza y cerebelo	89
Figura 47	Perfil de marcadores inflamatorios en cerebro de GASH/Sal tratados con VNS	90
Figura 48	Perfil de marcadores inflamatorios en plasma de GASH/Sal tratados con VNS	92
Figura 49	Captura de una matriz de marcadores inflamatorios de cada grupo y tejido estudiado	93
Figura 50	Recuento de neuronas inmunorreactivas a c-Fos	95
Figura 51	Fotografías que ilustran el marcaje de c-Fos	95
Figura 52	Conexiones de la porción caudal del núcleo del tracto solitario (cNTS).	112

Número	Título	Página
Tabla 1	Principales mecanismos de acción de los fármacos antiepilépticos (FAE)	17
Tabla 2	Valores del índice de severidad categorizado (cSI).	46
Tabla 3	Diccionario de comportamientos utilizado para la elaboración de los etogramas.	47
Tabla 4	Valores del índice de sedación (Sdi).	49
Tabla 5	Parámetros hematológicos y bioquímicos	87
Tabla 6	Valores del perfil de marcadores inflamatorios en tejido nervioso.	91
Tabla 7	Valores del perfil de marcadores inflamatorios en plasma	93

1. Introducción. Estado actual del tema

1.1. La epilepsia

De acuerdo con la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE), la epilepsia es una enfermedad cerebral definida por cualquiera de las siguientes condiciones:

- Al menos dos crisis epilépticas no provocadas (o reflejas) con más de 24 horas de separación entre ellas.
- Una crisis no provocada (o refleja) y una probabilidad de desarrollar más crisis al menos similar al riesgo de recurrencia después de dos crisis no provocadas (60%).
- Diagnóstico de un síndrome epiléptico.

Asimismo, se considera que un paciente ya no presenta epilepsia cuando ha padecido un síndrome asociado a un rango de edad y ya la ha superado, o cuando ha permanecido libre de crisis durante diez años, sin haber recibido medicación durante los últimos cinco (Fisher et al., 2014).

Por su parte, las crisis epilépticas se definen como la aparición transitoria de signos y/o síntomas debidos a la actividad anormal excesiva o síncrona del cerebro (Fisher et al., 2005). En 2017, la ILAE elaboró una clasificación de las crisis epilépticas, dividiéndolas en crisis de inicio focal, generalizado o desconocido (**Figura 1**). Las crisis focales se originan dentro de redes limitadas a un hemisferio, mientras que, las crisis generalizadas, implican la activación desde el inicio de redes bilaterales e involucran ambos hemisferios (Fisher et al., 2017).

Tipos de crisis epilépticas según la ILAE (2017)

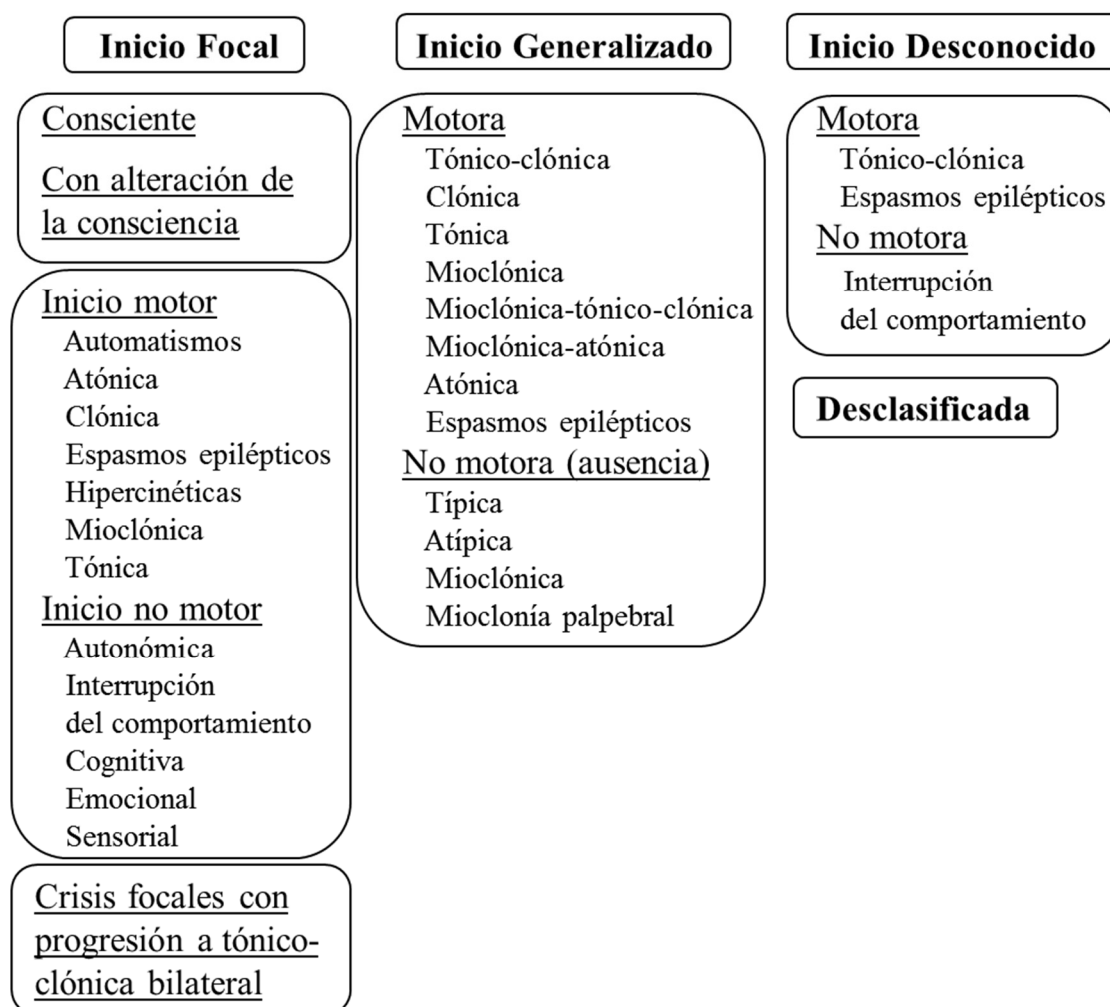


Figura 1. Tipos de crisis epilépticas según la ILAE. En las crisis focales, la especificación del nivel de consciencia es opcional. Los términos crisis focal consciente y crisis focal con alteración de la consciencia sustituyen a los términos crisis parcial simple y crisis parcial compleja. Las crisis focales con progresión a tónico-clónica bilateral reemplazan a las epilepsias generalizadas secundarias. Traducido y adaptado de Fisher et al. (2017).

En función de los tipos de crisis epilépticas presentes, se definen a su vez los tipos de epilepsia (**Figura 2**). En ocasiones, las características de las crisis, comorbilidades, y etiología, permiten el diagnóstico de síndromes epilépticos (Scheffer et al., 2017).

Se calcula que el 10% de la población general experimentará alguna crisis a lo largo de su vida, y entre el 1 y el 2% desarrollará epilepsia (Falco-Walter, 2020). En países desarrollados, se estima una incidencia anual de epilepsia alrededor de los 50 casos por cada 100000 habitantes y una prevalencia de 700 casos por cada 100000 habitantes (Hirtz et al., 2007). En España, la incidencia es de 31 a 57 casos/100000 habitantes/año, mientras que la prevalencia se sitúa alrededor de los 800 casos por cada 100000 habitantes (García-Ramos et al., 2011). En países del tercer mundo la incidencia es mayor (139 casos por cada 100000 habitantes y año) (Fiest et al., 2017), y se estima que el 75% de los habitantes de estas regiones no reciben el tratamiento necesario (Ngugi et

al., 2010). La epilepsia presenta dos picos de incidencia en función de la edad, siendo más común en la infancia y durante la vejez. Esta distribución se achaca a los síndromes epilépticos infantiles y al aumento de ictus, tumores y demencia en los ancianos (Beghi et al., 2019).

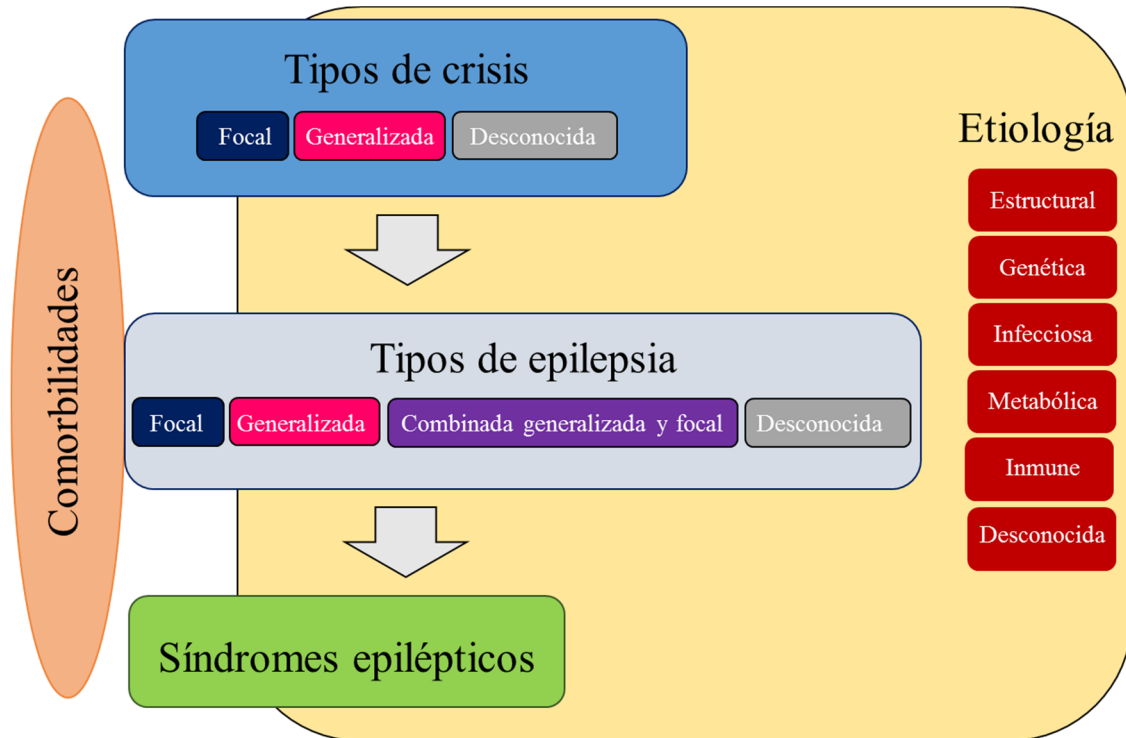


Figura 2. Tipos de epilepsia según la ILAE. Se define una categoría nueva, llamada combinada generalizada y focal, que incluye a los pacientes que muestran crisis focales y crisis generalizadas. Se establece que en la etiología de la epilepsia pueden intervenir factores estructurales, genéticos, infecciosos, metabólicos, inmunológicos o desconocidos. Las comorbilidades incluyen enfermedades psiquiátricas (depresión, ansiedad, autismo), alteraciones cognitivas (retraso mental, dificultades de aprendizaje, demencia) y otras condiciones médicas (problemas óseos y musculares, problemas digestivos, enfermedades respiratorias, dolor crónico, accidentes cerebrovasculares, migrañas, artritis, entre otros) (Keezer et al., 2016; Seidenberg et al., 2009). Traducido y adaptado de Scheffer et al. (2017).

1.2. Tratamiento de la epilepsia

1.2.1. Fármacos antiepilépticos

Existen referencias a la epilepsia desde las culturas más antiguas de la humanidad, en las que se consideraba una enfermedad sagrada. Hipócrates, en el siglo V a.C., fue el primero que trató de dar una explicación biológica a este fenómeno. Sin embargo, no fue hasta el siglo XIX cuando se produjeron los inicios del tratamiento farmacológico, con el bromuro de potasio. Desde entonces, se han desarrollado tres generaciones de fármacos antiepilépticos (FAE), con un aumento exponencial de la aprobación de nuevos medicamentos durante los últimos 30 años (**Figura 3**) (Löscher & Klein, 2020).

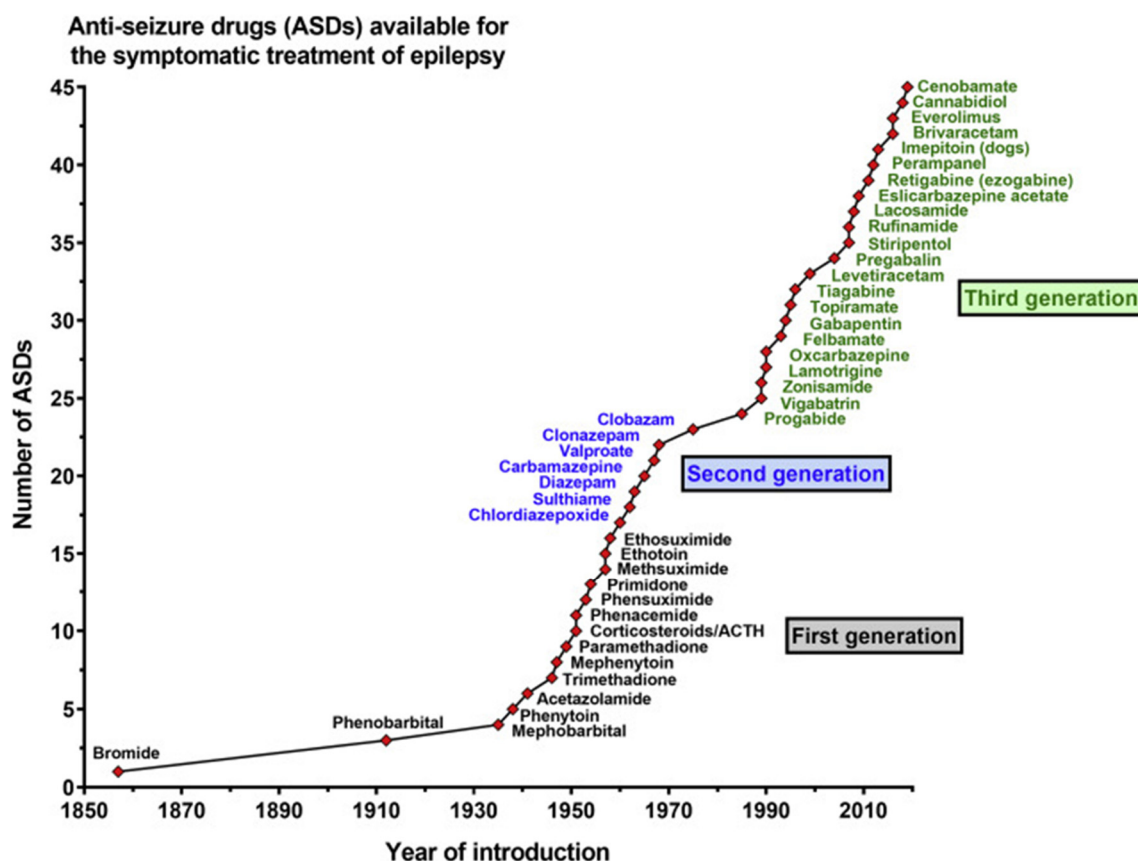


Figura 3. Fármacos antiepilépticos (FAE) introducidos en el mercado hasta el año 2020. Se incluye el año de la primera aprobación en Estados Unidos, Japón o un país europeo. La primera generación de FAE incluye desde 1857 a 1958, la segunda desde 1959 a 1975 y la tercera desde 1976 a la actualidad. Tomado de Löscher & Klein (2020).

Dado que las crisis epilépticas se desencadenan como consecuencia de desequilibrios que conducen a la hiperexcitación neuronal, el mecanismo de acción de los FAE se basa en la inhibición de procesos excitadores o el fortalecimiento de procesos inhibidores de la actividad neuronal (Hakami, 2021) (**Tabla 1**).

En general, el tratamiento de la epilepsia comienza con un único FAE, mientras que la politerapia se reserva para casos en los que varias monoterapias no han dado buen resultado (Löscher & Klein, 2021). Sin embargo, salvo en una minoría de casos, tampoco existen evidencias de que el tratamiento simultáneo con varios FAE produzca mejores efectos que la monoterapia (Schmidt, 2016). Después de haber probado el tratamiento con dos o más FAE, la ausencia de crisis se logra solo entre el 5 y el 8% de los pacientes (Jette et al., 2014). Los FAE de segunda y tercera generación han mostrado mejor tolerabilidad, menor toxicidad, y menores interacciones farmacológicas con respecto a los fármacos de primera generación, pero no han mostrado grandes mejoras en el control de las crisis (Kanner et al., 2018; Schmidt, 2011). De este modo, todavía existen aproximadamente un tercio de los pacientes que muestran epilepsia refractaria o farmacorresistente (Brodie et al., 2012; Chen et al., 2018), definida como aquella en la que no se consigue el control adecuado de las crisis mediante el uso indicado de dos FAE en monoterapia o en combinación (Kwan et al., 2010).

Tabla 1. Principales mecanismos de acción de los fármacos antiepilépticos (FAE). Traducido y adaptado de Hakami (2021).

Mecanismo	FAE
Inhibición de canales de sodio dependientes de voltaje	Fenitoína, fosfenitoína, carbamacepina, cenobamato, lamotrigina, oxcarbacepina, eslicarbacepina, lacosamida, y posiblemente topiramato, zonisamida, rufinamida y fenobarbital
Inhibición de la subunidad $\alpha 2\delta$ de canales de calcio dependientes de voltaje	Gabapentina, pregabalina
Inhibición de canales de calcio T dependientes de voltaje	Etosuximida
Activación de receptores GABA _A	Fenobarbital, benzodiacepinas, y posiblemente topiramato, felbamato, retigabina y estiripentol.
Inhibición de transportadores de GABA	Tiagabina
Inhibición de la GABA transaminasa	Vigabatrina
Modulación de la glicoproteína SV2A	Levetiracetam, brivaracetam
Varias dianas y mecanismos	Ácido valproico, felbamato, topiramato, zonisamida, y cannabidiol
Apertura de canales de potasio dependientes de voltaje KCNQ2-5 (Kv7.2-Kv7.5)	Retigabina (ezogabina)
Inhibición de receptores NMDA	Felbamato, topiramato y fenobarbital
Inhibición de receptores AMPA	Perampanel

Existen diferentes hipótesis que tratan de explicar los mecanismos de farmacorresistencia, entre las que destacan: la sobreexpresión de transportadores de FAE en órganos periféricos o en la barrera hematoencefálica que disminuyen sus niveles en sangre o reducen su acceso al cerebro; la remodelación por fenómenos de plasticidad aberrante causados por las crisis, factores genéticos, alteraciones en las dianas de los FAE o factores neurobiológicos que hacen que la farmacorresistencia sea inherente a la severidad de las propias crisis (Tang et al., 2017).

Sea como fuere, existen otras opciones terapéuticas en los pacientes con epilepsia refractaria, entre las que destaca la cirugía de la epilepsia, que a su vez incluye las técnicas de neuromodulación.

1.2.2. Cirugía de la epilepsia

La cirugía de la epilepsia incluye procedimientos ablativos o de resección del foco epileptógeno, procedimientos disruptivos que pretenden limitar la propagación de las crisis y técnicas de neuromodulación.

Los procedimientos de **resección del foco epileptógeno** son los más efectivos y, en gran parte de los pacientes, son curativos. En estos casos, la epilepsia ha de ser focal o de inicio focal y la lesión no debe afectar a la función neurológica. Entre estos procedimientos destacan (Rugg-Gunn et al., 2020):

- Corticectomía y lesionotomía en casos de epilepsia asociado a cavernomas, displasias y tumores.
- Lobectomía temporal anterior y amigdalohipocampectomía, con libertad de crisis entre el 70 y el 80% de los pacientes. Entre un 40 y un 50% de los pacientes siguen totalmente libres de crisis 20 años después de la cirugía. Son los procedimientos más utilizados dentro de todos los incluidos en la cirugía de la epilepsia.
- Lobectomías extratemporales, con eficacia ligeramente menor, pero, aun así, se alcanza la ausencia total de las crisis en aproximadamente el 60% de los pacientes.
- Hemisferectomía, que puede consistir en una extirpación de un hemisferio o consistir en una desconexión funcional.

Por otra parte, existen otros procedimientos, los denominados disruptivos, considerados como paliativos, y que por tanto tienen menores tasas de libertad de crisis, que pretenden **actuar sobre las vías de propagación** de las crisis epilépticas, para que sean más restringidas y no lleguen a ser generalizadas. Los más importantes son (Chakraborty & Rutka, 2010):

- Callosotomía. Indicada especialmente para crisis en las que se producen “drop attacks”. La intervención generalmente se limita a dos tercios del cuerpo calloso.
- Transección subpial múltiple. Aplicada en ocasiones en regiones corticales cuya resección no está recomendada debido a su función.

Hoy en día, algunas de estas técnicas quirúrgicas lesivas se pueden llevar a cabo con procedimientos más novedosos y menos invasivos como la radiocirugía estereotáctica, la terapia termal inducida con láser, o la ablación mediante ultrasonidos (Vakharia et al., 2018).

En algunos casos, estas cirugías pueden estar contraindicadas. El foco epileptógeno puede encontrarse en áreas elocuentes donde se desaconseja la resección quirúrgica al poder generar un déficit inadmisibles. Tampoco es útil en aquellos casos en que la epilepsia sea multifocal, o cuando no sea posible localizar el foco. Además, también hay que respetar la voluntad del paciente y puede que el paciente no quiera someterse a cirugía, pese a que se ha demostrado que la morbilidad y mortalidad asociada a la epilepsia refractaria es mayor que la que presentan las cirugías descritas (Sperling et al., 2016).

En estos casos, se plantea la posibilidad de recurrir a **técnicas de neuromodulación**. Existen tres técnicas de neuromodulación invasiva aprobadas por diferentes agencias

reguladoras para el tratamiento de la epilepsia refractaria, después de haber evaluado el resto de las opciones quirúrgicas disponibles (Ryvlin et al., 2021):

- La estimulación del nervio vago (VNS), aprobada en mayores de 4 años, para el tratamiento de epilepsias focales y generalizadas y síndrome de Lennox-Gastaut. La más utilizada y aprobada en gran parte del mundo.
- La estimulación cerebral profunda (DBS) del núcleo anterior del tálamo utilizada en epilepsia focal en Europa (2010) y América del Norte (2018).
- La neuroestimulación de respuesta (RNS) aprobada para epilepsia focal en Estados Unidos (2014). Se basa en la estimulación selectiva del foco epileptógeno cuando se desencadenan las crisis mediante la monitorización del EEG intracerebral.

Estos tratamientos se consideran paliativos, ya que no suelen provocar la eliminación total de las crisis. En el caso de las epilepsias focales, en las que las tres técnicas de neuromodulación están aprobadas, la RNS y la DBS muestran una reducción de las crisis significativamente mayor a la de la VNS, pero los efectos sólo son significativos durante el primer año. En los tres casos se alcanza una reducción de las crisis superior al 50% al cabo de tres años (Skrehot et al., 2023).

Aunque no han sido aprobados todavía, también se ha estudiado la aplicación de DBS en otras zonas como el núcleo centromedial del tálamo, núcleo pulvinar, córtex piriforme, área septal, núcleo caudado, núcleo subtalámico, cerebelo, hipocampo o el neocórtex (Chang et al., 2019). En el futuro, el objetivo es poder realizar protocolos de estimulación personalizados que prevengan la génesis y la propagación de las crisis mediante el mapeo y la modulación de las redes que estén alteradas en cada paciente (Piper et al., 2022).

Finalmente, existen otras técnicas de neuromodulación no invasivas, y que, por tanto, no precisan cirugía, cuya efectividad en epilepsia todavía se está evaluando:

- VNS transcutánea (tVNS). Puede aplicarse en la rama auricular del nervio vago o en el vago cervical (Ben-Menachem et al., 2015).
- Estimulación del nervio trigémino (eTNS) (Pack, 2013).
- Estimulación magnética transcraneal (TMS) (Walton et al., 2021).
- Estimulación transcraneal de corriente directa (tDCS) (Sudbrack-Oliveira et al., 2021).
- Estimulación transcraneal con ultrasonidos (TUS) (Lee et al., 2022).

De las mencionadas, solo la tVNS y la eTNS están aprobadas para su uso en Europa, y ninguna está autorizada en Estados Unidos (De Giorgio & Krahel, 2013).

En conjunto, los procedimientos que gozan actualmente de aprobación suponen un ahorro para los sistemas sanitarios a largo plazo en comparación con el mantenimiento del tratamiento farmacológico en casos de epilepsia refractaria (Kopciuch et al., 2019; Ngan Kee et al., 2023). Sin embargo, a pesar de sus potenciales beneficios, la cirugía de la epilepsia se encuentra infrautilizada. Se calcula que existe una diferencia en promedio

de más de 20 años entre el inicio de las crisis y la cirugía de la epilepsia, cuando ésta se produce (Vakharia et al., 2018). En España, se estima que se utiliza en menos del 10% de los casos en los que estaría indicada y se limita a los grandes hospitales del país (Valencia-Calderón et al., 2021).

1.2.3. Estimulación del nervio vago

La estimulación del nervio vago (VNS) es una técnica de neuromodulación que consiste en la estimulación eléctrica, crónica e intermitente del nervio vago cervical izquierdo. La estimulación se aplica en el nervio vago izquierdo debido a diferencias en la innervación cardíaca entre el vago izquierdo y derecho (Ardell & Randall, 1986; Capilupi et al., 2020).

Para llevar a cabo el tratamiento, es necesaria una cirugía en la que se implanta un generador de pulsos subcutáneo y un electrodo helicoidal bipolar en el vago cervical izquierdo. El procedimiento quirúrgico es sencillo y es realizado por un neurocirujano bajo anestesia general en un proceso que suele durar unas dos horas. El acceso al nervio vago izquierdo se realiza a nivel del cartílago tiroideos, en profundidad y en el lado medial de la vena yugular interna, y envuelto en el tejido lateral de la arteria carótida común. El electrodo se coloca abrazando el nervio y con el polo negativo orientado cranealmente para activar de forma preferente las aferencias vagales. El generador de pulsos se implanta en un bolsillo subcutáneo en la región claviclar o axilar. En el quirófano, se comprueba el funcionamiento del sistema y una o dos semanas tras la cirugía suele comenzar el protocolo de estimulación. Posteriormente, los parámetros se pueden modificar en función de la tolerabilidad y eficacia en cada paciente. La duración media de la batería de los dispositivos es de varios años, dependiendo de los parámetros de estimulación utilizados. Tras ese periodo, el dispositivo puede ser reemplazado en otra cirugía (García-March et al., 2008; Giordano et al., 2017).

El neuroestimulador tiene una carcasa de titanio, y se activa e interroga de forma no invasiva por telemetría a través de un campo magnético inducido por un programador que recibe y envía la información a otro dispositivo, como una Tablet o una PDA.

La VNS produce una estimulación conformada por trenes de pulsos de ondas cuadradas que vienen determinadas por los siguientes parámetros: intensidad, frecuencia, ancho de pulso y ciclos ON/OFF. Además, el sistema permite una estimulación extra, con parámetros diferentes, si se coloca un imán sobre la piel en la región en la que se encuentra implantado el marcapasos neurológico. Esta estimulación puede ser útil en los casos en los que los pacientes presentan un aura, o si las crisis se producen en presencia de otra persona. Finalmente, el sistema puede desconectarse en cualquier momento en caso de que el paciente presente molestias (Afra et al., 2021).

1.2.3.1. Desarrollo de la VNS. Efectividad clínica en epilepsia

En la década de 1880, el neurólogo James Leonard Corning utilizó instrumentos de compresión de la arteria carótida y de estimulación eléctrica vagal transcutánea para disminuir el flujo sanguíneo y así tratar las crisis epilépticas. Sin embargo, los graves efectos secundarios asociados a estos métodos hicieron que se abandonaran a finales del siglo XIX (Lanska, 2002). Entre finales de los años 30 y los años 50, se publicaron trabajos que mostraron cambios en el EEG inducidos por la estimulación eléctrica del nervio vago (Bailey & Bremen, 1938; Zanchetti, 1952). Sin embargo, no fue hasta los experimentos de Jacob Zabara en los años 80, cuando se produjo un salto importante tras constatar el efecto anticonvulsivo de la VNS en perros (Zabara 1985, 1992). En 1987, Jacob Zabara y Reese Terry diseñaron el primer neuroestimulador vagal, a través de su compañía Cyberonics, recién fundada, y hoy en día llamada LivaNova (Terry et al., 1991). El año siguiente, William Bell y James Kiffin Penry realizaron la primera cirugía de implantación de un sistema de VNS en un paciente (Penry & Dean, 1990). Posteriormente, la VNS fue aprobada en Europa en 1994 y en Estados Unidos en 1997 como tratamiento coadyuvante en mayores de 12 años afectados por epilepsia refractaria focal. Hoy en día, se ha aprobado su uso en otras regiones del mundo y se ha ampliado su indicación a epilepsias generalizadas, infantiles y al síndrome de Lennox-Gastaut (Ryvlin et al., 2021). En los últimos años, se han desarrollado nuevos dispositivos que incluyen algoritmos de detección de las crisis basados en la función cardíaca (Tzadok et al., 2019) y formas de VNS no invasiva (Hamer & Bauer, 2019).

Actualmente, más de 125000 pacientes han recibido tratamiento con VNS (Afra et al., 2021). Muchos de estos pacientes se han beneficiado de una **reducción de la frecuencia de las crisis**. Generalmente, se observa una tasa de respondedores a la VNS que se sitúa entre el 45 y el 65%, definiendo a los respondedores como a aquellos pacientes que muestran al menos una reducción de la frecuencia de las crisis superior al 50%. Además, la mayoría de los estudios muestran que la eficacia del tratamiento es progresiva y tiende a aumentar con el tiempo (Toffa et al., 2020). Destaca un estudio realizado en 2016, en el que se analizaron datos de 5554 pacientes, y se obtuvo una tasa de respuesta del 49% durante los primeros 4 meses de tratamiento, y de un 63% durante el tercer y cuarto año de tratamiento. Sin embargo, pocos pacientes alcanzaron la ausencia de crisis, (alrededor del 8%). Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados mediante la revisión de datos de 2869 pacientes correspondientes a 78 estudios disponibles en la literatura (Englot et al., 2016). Destaca otro metaanálisis que incluyó 61 estudios y 5223 pacientes hasta el año 2020, y que obtuvo tasas de respuesta a la VNS del 42,1% a los 3 meses desde el inicio del tratamiento, del 45,5% a los 6, del 40,1% a los 12, del 45,1% a los 24, del 48,2% a los 36, del 50,2% a los 48 y del 50,8% a los 60 (Mao et al., 2022).

La VNS también merma la duración, la intensidad o severidad de las crisis e incluso el consumo de fármacos antiepilépticos. En una serie relativamente reciente de nuestro entorno (Martorell-Llobregat et al., 2022), se obtuvo una reducción de la frecuencia de

las crisis superior al 50% en el 57,17% de los intervenidos, un 88% de los pacientes mostraron una menor duración de las crisis, en el 65% se redujo la intensidad o severidad, en un 66% se redujo el consumo de fármacos y en el 93% mejoró la calidad de vida.

No obstante, el efecto de la VNS también puede **mejorar otros aspectos de la calidad de vida** de los pacientes con epilepsia. Se han descrito mejoras en el estado post-ictal (55-62%), en las crisis en racimo (48-56%), del estado de alerta (58-63%), cambios de humor (43-49%), comunicación verbal (38-45%), logros académicos y profesionales (29-39%) y en la memoria (29-38%) (Englot et al., 2017).

Los **efectos secundarios** de la VNS pueden estar asociados al procedimiento quirúrgico (hematomas, infecciones, parálisis de las cuerdas vocales) o a efectos de la estimulación eléctrica (ronquera, disfonía, disnea, tos, dolor, parestesia), siendo la ronquera el efecto más común. En la mayoría de los casos, estos efectos son leves, aunque se han descrito casos de asistolia o bradicardia severa (Iriarte et al., 2009). Los efectos asociados a la estimulación suelen disminuir a lo largo del tiempo (Morris & Mueller, 1999).

Desde sus inicios, ha existido discusión sobre cuáles son los **parámetros de estimulación** óptimos. En la clínica, el rango de parámetros utilizados es variable (Thompson et al., 2021):

- **Intensidad:** entre 0,25 y 3,75 mA. Durante los primeros 3 meses tras la cirugía, la intensidad de corriente no influye en la respuesta a la terapia (Bunch et al., 2007).
- **Frecuencia:** entre 20 y 50 Hz (más común entre 20 y 30 Hz). Las frecuencias mayores de 50Hz pueden dañar el nervio (Agnew & McCreery, 1990).
- **Ancho de pulso:** entre 130 y 500 μ s (más común 250 μ s y 500 μ s). La intensidad de corriente mínima para desencadenar una respuesta electrofisiológica depende de este parámetro, de forma que anchos de pulso menores precisan de mayor intensidad para ejercer un mismo efecto. Sin embargo, corrigiendo este efecto, los anchos de pulso mayores producen un mayor gasto de batería y por eso se establece este rango (Helmers et al., 2012; Mollet et al., 2013; Smith et al., 2001).
- **Ciclos ON/OFF:** 7-120 s ON/ 18 s-60 min OFF. La configuración más frecuente es 30s ON/5min OFF. Ciclos más cortos aumentan el gasto de la batería y no producen mejores efectos (DeGiorgio et al., 2005).

Los programas de alta estimulación (mayor frecuencia, intensidad y ancho de pulso) ha mostrado mayor efecto que los de baja estimulación, por ser ésta presumiblemente subterapéutica (Panebianco et al., 2016, 2022). Según un estudio reciente, que evaluó la respuesta a la VNS en función de los parámetros de estimulación utilizados en 1178 pacientes, los parámetros que podrían maximizar la respuesta consistirían en una intensidad de 1,625mA, ancho de pulso de 250 μ s, frecuencias entre 20 y 30Hz, y ciclos de 30s ON y 3min OFF (Fahoum et al., 2022).

Los sistemas de **estimulación cerrada “closed-loop VNS”** aplican estimulaciones adicionales cuando se detecta taquicardia asociada a las crisis, basándose en investigaciones que afirman que este fenómeno se produce en la fase inicial de las crisis en un 82% de los pacientes (Eggleston et al., 2014). Se ha comparado su efectividad con la de otros sistemas de VNS, y, hasta el momento, la eficacia de ambas variantes es similar, aunque parece que algunos pacientes podrían mostrar un beneficio adicional al remplazar de los dispositivos antiguos por los más modernos (Hamilton et al., 2018; Muthiah et al., 2022; Winston et al., 2021).

Por otra parte, la efectividad de la **VNS no invasiva** en epilepsia sigue siendo discutida. En un ensayo clínico publicado en 2016, no se observó una mayor respuesta en el grupo tratado con VNS auricular transcutánea sobre el grupo simulado (Bauer et al., 2016).

No existen **marcadores de respuesta** claros tras la VNS. La dificultad de encontrar qué pacientes pueden beneficiarse de la terapia provoca que haya pacientes que se sometan a ella y no obtengan resultados. Del mismo modo, otros pacientes que podrían beneficiarse del tratamiento no acceden a él. Aunque existe discusión en la literatura, su efectividad podría ser mayor en epilepsias generalizadas, en casos no lesionales y si la edad de inicio de la epilepsia es superior a los 12 años (Englot et al., 2016). La respuesta podría ser mejor en esclerosis tuberosa (Hajtovic et al., 2022), síndrome de Lennox Gastaut (Martorell-Llobregat et al., 2022) y epilepsia postraumática que en otros tipos de epilepsia (Englot et al., 2011). Los pacientes con una epilepsia de menor duración tienen más probabilidades de respuesta a la VNS (Fahoum et al., 2022).

1.2.3.2. Uso en otras patologías

En los últimos años, se han incrementado las posibilidades terapéuticas de la VNS. Dados los efectos sobre áreas relacionadas con la calidad de vida de los pacientes, se investigó su efecto sobre la **depresión farmacorresistente**. La VNS fue aprobada para el tratamiento coadyuvante de esta enfermedad en adultos en Europa en 2001 y en Estados Unidos en 2005, y los estudios llevados a cabo desde entonces han demostrado un efecto beneficioso para los pacientes (Bottomley et al., 2020). Actualmente se está llevando a cabo un estudio prospectivo ciego multicéntrico a gran escala en Estados Unidos (Conway et al., 2020).

En estados Unidos, además, se permite el uso de VNS cervical transcutánea (Gammacore™) desde 2018 para el tratamiento de la **migraña**, y desde 2019 para la **cefalea en racimos** (Silberstein et al., 2016; Tassorelli et al., 2018).

La VNS se ha mostrado beneficiosa también en la **rehabilitación tras ictus** (Dawson et al., 2020; Pruitt et al., 2021). Por ello, la FDA ha aprobado un dispositivo implantable (Vivistim™) que permite aplicar VNS durante las sesiones de rehabilitación (Liu et al., 2022).

En 2015, se aprobó un dispositivo de estimulación vagal abdominal (Maestro, EnteroMedics Inc.) como tratamiento para la **obesidad**. En este caso, la estimulación es de alta frecuencia (5000 Hz), se aplica de forma bilateral y bloquea la actividad del nervio (Hwang et al., 2016).

Además, existen un amplio rango de patologías que todavía no gozan de aprobación, en las que se ha evaluado la potencial aplicabilidad de la VNS, en distintas fases de desarrollo:

- **Trastornos psiquiátricos:** ansiedad (George et al., 2008), trastorno por estrés postraumático (Intyre, 2019), esquizofrenia (Hasan et al., 2015), trastorno bipolar (Marangell et al., 2008) y trastornos del espectro autista (Hull et al., 2015).
- **Enfermedades de carácter inflamatorio** como la artritis reumatoide (Koopman et al., 2014), enfermedad inflamatoria intestinal (Marshall et al., 2015; Meregnani et al., 2011) enfermedad de Crohn (Sinniger et al., 2020), sepsis (Wu et al., 2023).
- Se ha estudiado su efecto en pacientes que padecen **Parkinson** (Mondal et al., 2019) y **Alzheimer** (Sjögren et al., 2002; Vargas-Caballero et al., 2022).
- Por otro lado, se investiga su efecto en **enfermedades cardiovasculares**, entre las que destaca la insuficiencia cardíaca. Existe un dispositivo para la estimulación del vago eferente (CardioFit, NioControl Medical Ltd), aunque se ha observado disparidad en los resultados obtenidos (De Ferrari et al., 2011; Dusi & De Ferrari, 2021; Ottaviani et al., 2022).
- También, se ha estudiado el efecto de la tVNS en el **COVID persistente**, con disminución de marcadores inflamatorios y mejoras a nivel psicológico (Badran et al., 2022; Tornero et al., 2022).
- Otra área de estudio es su impacto sobre el **rendimiento cognitivo** (Boon et al., 2006). Las fuerzas áreas del ejército de Estados Unidos están estudiando el efecto de la tVNS para aumentar el rendimiento en la realización de tareas (McIntire et al., 2019).
- **Otras patologías** en las que se estudia la aplicación de la VNS son diabetes (Okdahl et al., 2021), fibromialgia (Lange et al., 2011), tinnitus (Engineer et al., 2011; Stegeman et al., 2021), lesión traumática cerebral (Hakon et al., 2020) y daño pulmonar (Dos Santos et al., 2011), entre otras.

Incluso, como potencial tratamiento para algunas de las enfermedades mencionadas, en los últimos años se han propuesto en fase experimental o de forma teórica sistemas “closed-loop” de formas de VNS auricular transcutánea mediante la detección de la actividad motora, respiratoria, cardíaca, electroencefalográfica o niveles de glucosa. La utilidad de estos sistemas está aún por determinar (Yu et al., 2022).

1.2.3.3. Mecanismo de acción

A pesar de que la VNS comenzó a utilizarse en la clínica hace 30 años, el conocimiento de su mecanismo de acción sigue siendo incompleto y es objeto de discusión. Esto se achaca a que se dio el salto al tratamiento en pacientes para los que no existían otras alternativas como consecuencia de su eficacia, cuando todavía no se había profundizado en la base fisiológica de este tratamiento. Los estudios llevados a cabo desde entonces han permitido clarificar algunas cuestiones, pero muchas hipótesis continúan siendo discutidas.

El **nervio vago** o neumogástrico es el X par craneal y es el más extenso de todos. Su origen se encuentra en el surco retro-olivar y sale del cráneo a través del foramen yugular; a continuación, forma el ganglio yugular y el ganglio nodoso, y viaja entre la arteria carótida común y la vena yugular interna envuelto por la vaina carotídea. A lo largo de su trayectoria, surgen varias ramas: la primera de ellas es la rama auricular del vago o nervio de Arnold, que surge a partir del ganglio yugular e inerva el oído externo; el resto de las ramas permiten inervar la epiglotis, laringe, faringe, esófago, tráquea, pulmones, el corazón, el arco aórtico y órganos gastrointestinales, llegando hasta el colon ascendente. No parece existir inervación vagal de los riñones, glándulas suprarrenales órganos linfáticos y tejido adiposo, aunque es controvertido sobre todo en el caso del bazo (**Figura 4A**). Está compuesto aproximadamente en un 80% por fibras aferentes y en un 20% por fibras eferentes. Las fibras aferentes hacen relevo en el complejo vagal dorsal, particularmente en el núcleo del tracto solitario (NTS). Las fibras eferentes se originan en el núcleo dorsal del vago y transporta también las fibras originadas en el núcleo ambiguo que proporcionan información branquiomotora a los músculos intrínsecos laríngeos, de la faringe y el músculo tensor del velo del paladar (Neuhuber & Berthoud, 2021). Se postula que la VNS ejerce su mecanismo de acción a través de las aferencias vagales, por lo que el NTS y las áreas conectadas con él, serían los responsables del modo de actuación de la terapia (**Figura 4B**) (Hachem et al., 2018).

Las fibras vagales se pueden clasificar en los tipos A, B y C, las cuales presentan diferentes tamaños, velocidades de conducción y propiedades fisiológicas. Las fibras A ($A\alpha$, $A\beta$, $A\gamma$ y $A\delta$) y B están mielinizadas, mientras que las fibras C no están mielinizadas y son de menor tamaño, por lo que su velocidad de conducción es menor y su umbral de activación, mayor. En los primeros estudios, llevados a cabo con animales, el efecto anticonvulsivo de la VNS se achacaba a su acción sobre las fibras C (Woodbury & Woodbury, 1990; Zabara, 1992). Actualmente, se piensa que no están involucradas en el mecanismo de acción de la VNS, ya que su destrucción con

capsaicina no modifica al efecto de la terapia (Krahl et al., 2001). Además, su activación se asocia con bradicardia severa (Paintal, 1973) y ésta no se produce con los parámetros de VNS habituales (Elam et al., 1993). Por lo tanto, se postula que la activación máxima de las fibras A y B produciría el mayor efecto terapéutico. En rata, bajo anestesia y empleando modelos matemáticos complejos, se ha conseguido correlacionar los cambios en el EMG laríngeo, en la frecuencia cardíaca y en la frecuencia respiratoria con el grado de activación de fibras A, B y C, respectivamente (Chang et al., 2020). Sin embargo, en la clínica todavía no existe ninguna respuesta que permita determinar qué fibras y en qué magnitud se están activando en cada paciente (Helmers et al., 2012). Quizá una metodología recientemente desarrollada no invasiva, que consiste en medir los potenciales evocados motores laríngeos (LMEP) inducidos por la VNS, podría corresponderse con la actividad de fibras A y ser útil para determinar los parámetros de estimulación más adecuados. Sin embargo, en este estudio preliminar no existieron diferencias en los LMEP entre respondedores y no respondedores (Vespa et al., 2019).

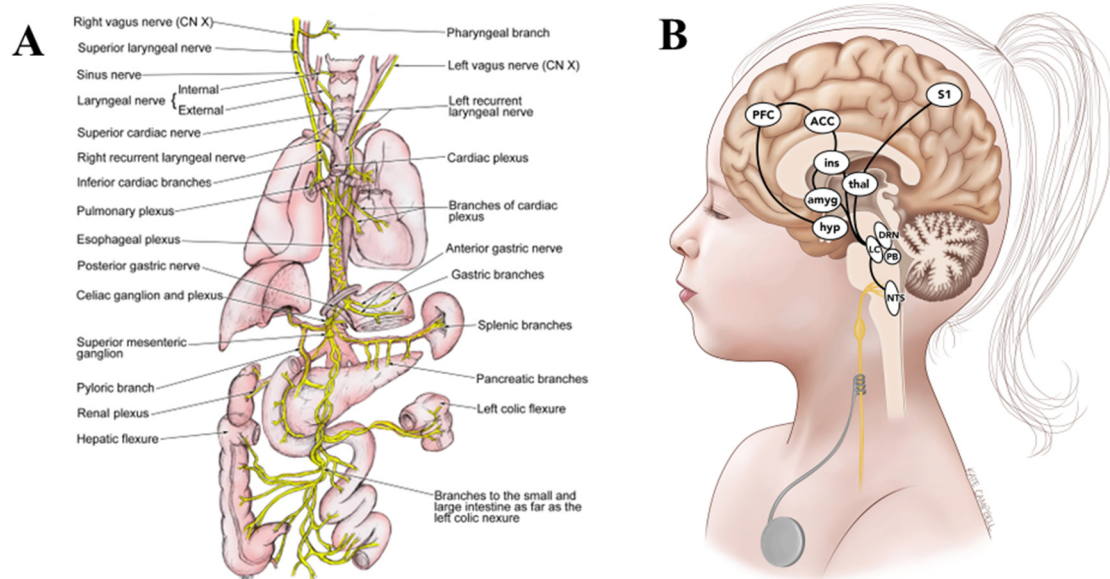


Figura 4. El nervio vago y la VNS. **A.** Anatomía del nervio vago. Tomado de Tewfik, 2017. **B.** Áreas cerebrales que se creen más importantes en el mecanismo de acción de la VNS. ACC = córtex cingulado anterior; amyg = amígdala; hyp = hipotálamo; ins = ínsula; PB = núcleo parabraquial; PFC = córtex prefrontal; S1 = córtex somatosensorial primario; thal = tálamo. Tomado de Hachem et al., 2018.

Algunos estudios han propuesto que, dado que la actividad hipersincrónica es una característica de las crisis epilépticas, la VNS produciría **desincronización de la actividad neuronal**. Otros estudios apuntan a que este efecto en el EEG es mayor en respondedores que en no respondedores (Bodin et al., 2015; Sangare et al., 2020). Esta desincronización podría deberse a la activación de áreas que participan en la regulación o génesis de las crisis y que conducen a la disminución de la excitabilidad cortical (Lyubashina & Pantelev, 2009).

Por otra parte, se ha señalado que algunos **neurotransmisores**, fundamentalmente la noradrenalina y la serotonina, serían los responsables del efecto anticonvulsivo de la terapia:

- La VNS activa el núcleo noradrenérgico más importante, el locus coeruleus (LC), y produce un aumento de este neurotransmisor en hipocampo, amígdala y corteza prefrontal (Hassert et al., 2004; Roosevelt et al., 2006).
- La serotonina se ha visto implicada, ya que tras la VNS crónica, se produce la activación del núcleo dorsal del rafe (Dorr & Debonnel, 2006).
- En un estudio se determinó que la respuesta terapéutica a la VNS se correlacionaba con la normalización de la densidad de los receptores GABA_A corticales (Marrosu et al., 2003).

Otros estudios sugieren una **disminución de la excitabilidad en hipocampo y amígdala, así como mecanismos de plasticidad** (Biggio et al., 2009). La VNS se ha mostrado efectiva en modelos de kindling (Alexander & McNamara, 2012). Además, el tratamiento modifica la actividad en ambas regiones y produce alteraciones en la expresión de proteínas relacionadas con la plasticidad sináptica tanto en hipocampo como amígdala (Alexander et al., 2017; Larsen et al., 2016).

También, se piensa que la VNS podría ejercer su efecto a través de un mecanismo **antiinflamatorio (Figura 5)**.

- El nervio vago es sensible a los niveles de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α), especialmente de IL-1 β . La información asociada al aumento de estas moléculas se transmite vía NTS y de allí al núcleo paraventricular del hipotálamo, produciéndose la activación del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal. La producción de factor liberador de corticotropina conduce a la liberación de hormona adrenocorticotropa en la hipófisis, lo que a su vez estimula la liberación de glucocorticoides por las glándulas suprarrenales (Bonaz et al., 2016). La VNS, podría activar este mecanismo induciendo la respuesta antiinflamatoria (De Herdt et al., 2009; Hosoi et al., 2000).
- Por otra parte, se ha postulado que el nervio vago modula el denominado “reflejo inflamatorio” o vía colinérgica antiinflamatoria (CAP). Inicialmente, se describió que la actividad del nervio vago eferente conduce a la liberación de acetilcolina en diferentes órganos, la cual interacciona con receptores nicotínicos en los macrófagos e inhibe la liberación de citocinas proinflamatorias. (Tracey Kevin J, 2005). Posteriormente, se ha observado que los eferentes vagales en el ganglio mesentérico liberan acetilcolina que actúa en los receptores α -7-nicotínicos en el nervio esplénico, que a su vez libera noradrenalina, y ésta se une al receptor adrenérgico β 2 de los linfocitos T CD4 del bazo, los cuales liberan acetilcolina que se une a los receptores α -7-nicotínicos de los macrófagos y se produce la inhibición de la liberación de citocinas proinflamatorias (Olofsson et al., 2012).

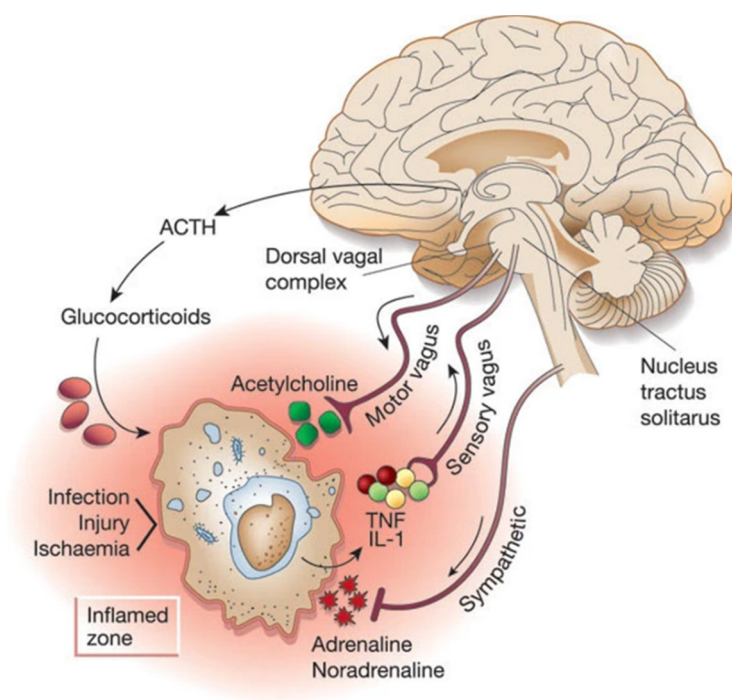


Figura 5. Reflejo inflamatorio mediado por el nervio vago. La activación del vago aferente produce la activación del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal. La activación del vago eferente produce la inhibición de los macrófagos y de la liberación de citocinas proinflamatorias. Tomado de Tracey et al., (2005).

Los **efectos sobre el flujo sanguíneo cerebral** constituyen otra hipótesis del mecanismo de acción de la terapia, aunque los resultados obtenidos han sido contradictorios. Algunos estudios han mostrado que la VNS se asocia a un aumento del flujo sanguíneo cerebral en el tálamo bilateral, hipotálamo, cerebelo, giro postcentral derecho, córtex frontal y córtex cingulado (Henry et al., 1999, 2004) mientras que, en otro estudio la VNS produjo una disminución del flujo en el tálamo izquierdo (Vonck et al., 2000).

Otra hipótesis es que la VNS debería su efecto a la **activación de la formación reticular**, puesto que otros estímulos o formas de tratamiento que actúan sobre ella, tiene efectos similares (Aalbers et al., 2011).

Finalmente, **los mecanismos de acción de la VNS auricular transcutánea** son todavía más controvertidos, debido a que mediante este tipo de VNS sólo se estimulan las fibras aferentes del oído externo, y no la cantidad y los distintos tipos de fibras que se estimulan con la VNS invasiva.

1.3. Investigación en modelos animales

1.3.1. Modelos animales de epilepsia y crisis epilépticas

Existen gran cantidad de modelos animales que han contribuido al conocimiento de los mecanismos de epileptogénesis y que han sido utilizados para la validación de los tratamientos disponibles en la actualidad. Esto se debe a varios factores: en primer

lugar, la epilepsia se puede dar de forma natural o se puede modelar con diferentes métodos en muchas especies; en segundo lugar, la gran diversidad de tipos de epilepsia humana hace que a su vez existan muchos modelos para el estudio de cada uno de estos tipos de epilepsia. Además, dada la complejidad de esta patología, se requiere constatar los hallazgos obtenidos en varios modelos, ya que ningún modelo es capaz de recrear todos los aspectos de la epilepsia humana. Igualmente, las diferencias en el sistema nervioso y las características de las epilepsias humanas con respecto a lo que puede observarse en otras especies hacen que el conocimiento en estos modelos sea parcial, pero esa característica reduccionista hace posible a su vez poder abordar determinadas cuestiones complejas.

La epilepsia se caracteriza por la propensión a desarrollar crisis recurrentes espontáneas. Por lo tanto, la inducción de crisis en un animal no epiléptico no supone un modelo real de epilepsia. De esta manera, muchos de los modelos que son considerados como modelos de epilepsia, son en realidad modelos de crisis convulsivas. No obstante, la investigación en estos modelos sigue siendo de utilidad. El uso de unos u otros dependerá del objetivo de la investigación.

La clasificación de los modelos animales puede realizarse en función del tipo de crisis que presentan (focales o generalizadas, con sus respectivas subdivisiones) o en función del método de inducción de las crisis. Según este último criterio se distinguen (Coppola & Moshé, 2012; Kandratavicius et al., 2014; Löscher, 2011; Marshall et al., 2021; Murphree et al., 2007):

- Modelos genéticos:
 - Crisis espontáneas recurrentes: Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg (GAERS), Wistar Albino Glaxo/Rijwik (WAG/Rij), ratón letárgico *Cacnb4*, perros y otros animales naturalmente epilépticos, modelos transgénicos en organismos modelo (rata, ratón, pez cebra, *Drosophila*, *C. Elegans*, *X. laevis*)
 - Crisis reflejas:
 - Crisis audiógenas: rata Kurshinsky-Molodkina (KM), Genetically Epilepsy-Prone Rat (GEPR), Genetic Audiogenic Seizures Hamster, Salamanca (GASH/Sal), P77PMC, Wistar Audiogenic Rat (WAR), ratones dilute brown agouti coat color (DBA), WAG/Rij.
 - Crisis fotosensibles: babuínos
 - Crisis audiógenas y fotosensibles: pollos Fayoumi (Fepi)
 - Por manejo y exposición a estímulos novedosos: Jerbos de Mongolia.
- Inducción de crisis en animales no epilépticos:
 - Crisis inducidas eléctricamente: electroshock (máximo o MES y mínimo o 6 Hz), estimulación local (más frecuente en neocórtex y áreas límbicas)

- Crisis inducidas químicamente: Pentilenotetrazol (PTZ), ácido kaínico (KA), pilocarpina (PILO), flurotil, ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), γ -hidroxibutirato, estriknina, bicuculina, picrotoxina, aplicación focal de metales, toxina tetánica, penicilina, cocaína.
- Modelos de epilepsia postraumática: lesión por percusión de fluido, impacto cortical controlado, impacto-aceleración por caída libre de peso, lesión craneal cerrada (, lesión cerebral penetrante balística, inyecciones en el córtex sensorimotor y los modelos “Blast”.
- Optogenética (Cela et al., 2019).
- Infecciones por bacterias, parásitos, hongos o virus (Becker, 2018).
- Hipertermia.
- Hipoxia neonatal.
- Modelos de desarrollo cortical anormal: lesión cortical por congelación, irradiación *in utero*, metilazoximetanol

Asimismo, existen modelos de kindling, que consisten en la inducción de crisis de forma repetida. El kindling mediante crisis inducidas químicamente (KA, PILO, PTZ) o eléctricamente (implantación de electrodos en amígdala o hipocampo), puede utilizarse para generar modelos de estatus epiléptico y para el estudio de mecanismos de epileptogénesis. Los modelos de crisis reflejas también permiten la realización de kindling mediante la exposición repetida al estímulo que desencadena las crisis.

Por último, existen algunos modelos diseñados para el estudio de los mecanismos de farmacoresistencia, que se basan en la inducción de crisis y en la separación de animales en grupos respondedores y no respondedores a determinados FAE para tratar de establecer hipótesis. Algunos de ellos son modelos de kindling en rata resistentes a la fenitoína o al fenobarbital, perros epilépticos, el modelo 6Hz, kindling previa administración de lamotrigina, crisis inducidas con PTZ previa administración de PILO, y modelos de desarrollo cortical (Löscher, 2017; Potschka, 2012).

El descubrimiento y la validación de la mayoría de los FAE disponibles se ha realizado en los modelos MES y PTZ, debido a su facilidad de uso. Sin embargo, algunos FAE que han mostrado efectividad clínica, entre los que destaca el levetiracetam, no han mostrado un efecto anticonvulsivo en estos modelos, pero sí en modelos de kindling. Por el contrario, otros FAE desarrollados gracias a los modelos MES y PTZ, como los antagonistas de receptores NMDA, no presentan efecto anticonvulsivo en estos modelos. Por lo tanto, estos modelos son complementarios unos a otros, y malos resultados en un modelo concreto no deben descartar completamente la posibilidad de seguir estudiando sus mecanismos de acción y su potencial utilidad clínica (Corrales-Hernández et al., 2023).

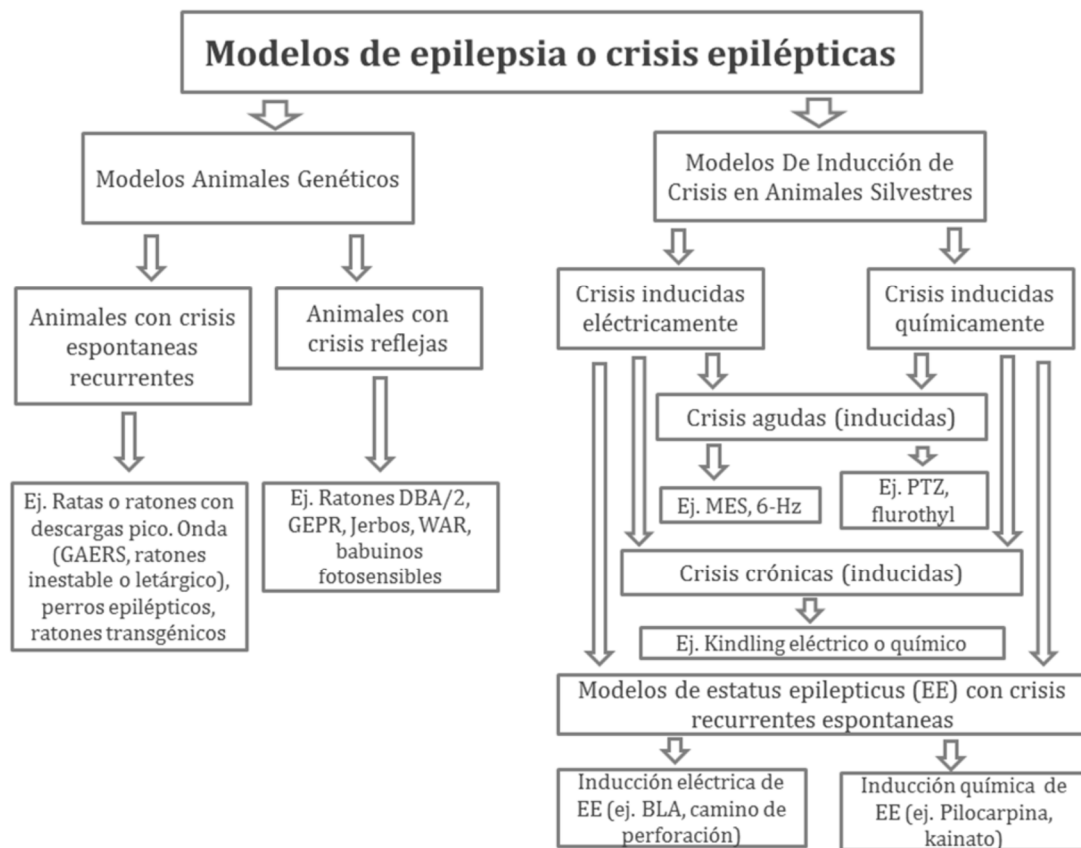


Figura 6. Clasificación de los modelos de epilepsia y crisis epilépticas. Se incluyen los ejemplos más relevantes. Traducido y adaptado de Löscher (2011).

1.3.1.1. El hámster GASH/Sal

El hámster GASH/Sal (Genetic Audiogenic Seizures Hamster/Salamanca) es un modelo de crisis reflejas audiógenas desarrollado en la Universidad de Salamanca que proviene de una línea originaria de la Universidad de Valladolid, el GPG:Vall (Gómez–Palomo–Gómez, Valladolid), antes de que desapareciera en su institución de origen (Muñoz et al., 2017).

Ante la exposición a un sonido intenso, el hámster GASH/Sal presenta crisis caracterizadas por una fase de carrera salvaje, seguida por convulsiones tónico-clónicas y un periodo de estupor. Estas crisis son similares a las observadas en otros modelos de epilepsia audiógena. Las crisis pueden inducirse a partir de la maduración del sistema auditivo, aunque la susceptibilidad de los animales disminuye a partir de los 6 meses.

En los últimos años, se han desarrollado diferentes líneas de investigación con el objetivo de caracterizar y validar el modelo:

- Caracterización anatómica y funcional del sistema auditivo: el GASH/Sal muestra un umbral auditivo más alto y alteraciones en la conducción de las señales auditivas, que, además, son ligeramente diferentes en el oído izquierdo y

derecho. Presentan alteraciones cocleares, entre las que destaca la desorganización de los estereocilios de las células ciliadas, la pérdida de neuronas del ganglio espiral y la atrofia de la estría vascular. Además, destaca la alteración de los transportadores vesiculares de glutamato Vglut1 y Vglut2, prestina, cadherina23 y protocaderina 15, claves en la mecanotransducción y la amplificación coclear. También se han descrito alteraciones morfológicas de las neuronas del sistema eferente olivococlear y un menor tamaño de la oliva lateral superior (Sánchez-Benito et al., 2017, 2020).

- Estudios genéticos: El GASH/Sal presenta un patrón de herencia autosómica recesiva para la susceptibilidad audiógena. Se han analizado sus diferencias genéticas con respecto al hámster sirio, considerado el control (Muñoz et al., 2017) y se han estudiado las variantes génicas presentes en el modelo, algunas de las cuales también se han encontrado en pacientes con epilepsia (Díaz-Casado et al., 2020). Además, en el foco epileptógeno, se ha realizado un análisis del transcriptoma tras las crisis, (Díaz-Rodríguez et al., 2020). Igualmente, se ha obtenido el perfil de expresión proteica en el foco epileptógeno en condiciones basales, identificándose la expresión diferencial de 10 proteínas relacionadas con epilepsia (García-Peral et al., 2023). Por otra parte, se han realizado estudios comparando la expresión génica del GASH con otro modelo de epilepsia, la rata WAR (Damasceno et al., 2020; López-López et al., 2017).
- Validación de fármacos antiepilepticos en estudios agudos y crónicos: se han estudiado FAE como: ácido valproico, fenobarbital, levetiracetam, lamotrigina, retigabina, cannabidiol, acetato de eslicarbazepina (Barrera-Bailón et al., 2013, 2017; Cabral-Pereira et al., 2021).
- Caracterización del EEG: se ha descrito un registro similar al observado en otros modelos de crisis tónico-clónicas generalizadas (Carballosa-Gonzalez et al., 2013).
- Neuroimagen: estudios preliminares de PET-FDG han mostrado que la mayor disminución del metabolismo tras las crisis se produce en el colículo inferior y el cerebelo, lo que refuerza la hipótesis de que el colículo inferior es el foco epileptógeno (Fuerte-Hortigón et al., 2018).
- Estudios de kindling: la estimulación repetida modifica las crisis convulsivas y conduce al reclutamiento de áreas límbicas y mesencefálicas y altera procesos de muerte neuronal y neurogénesis (Hernández-Noriega, 2017).
- Análisis de exosomas, comprobándose que estas pequeñas vesículas extracelulares rodeadas de membrana, que juegan un papel en la comunicación intercelular, podrían tener utilidad como biomarcadores (Zeballos et al., 2022).

- Estudios neuroquímicos:
 - Se ha observado la modificación de la actividad y expresión de la óxido nítrico sintasa en respuesta a las crisis (Prieto-Martín et al., 2012).
 - Se ha estudiado la distribución de receptores cannabinoides (Fuerte-Hortigón et al., 2021).
 - Se ha observado la alteración de la neurotransmisión GABAérgica en el GASH/Sal, asociada a alteraciones en la expresión de las subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$ del receptor GABA_A y a la deficiencia en el cotransportador K^+/Cl^- (KCC2) en estado basal con respecto al hámster control. Además, se ha descrito su modulación y la del cotransportador $Na^+/K^+/Cl^-$ por las crisis. (Bonet-Fernández et al., 2023; Prieto-Martín et al., 2017).

El origen de las crisis audiógenas es troncoenfálico, y el foco epileptógeno es el colículo inferior (CI). En varios modelos de epilepsia audiógena se ha demostrado que la lesión del CI inhibe las crisis (Browning, 1986). De igual modo, la estimulación química o eléctrica del CI es capaz de inducir las crisis (Wada et al., 1970). Se ha determinado que el desarrollo de la carrera salvaje depende de la activación de las capas profundas del colículo superior, mientras que las convulsiones tónico-clónicas dependen de la activación de la sustancia gris periacueductal y la formación reticular, que producen a su vez la activación de las motoneuronas de la médula espinal. Durante la depresión postictal, únicamente se mantiene hiperactiva la formación reticular pontina (Faingold, 2002; Fedotova et al., 2021). En el hámster GASH/Sal, la inducción de las crisis, produce la activación del colículo inferior y de la sustancia gris periacueductal, determinado mediante el análisis de la expresión de c-Fos (Muñoz et al., 2017).

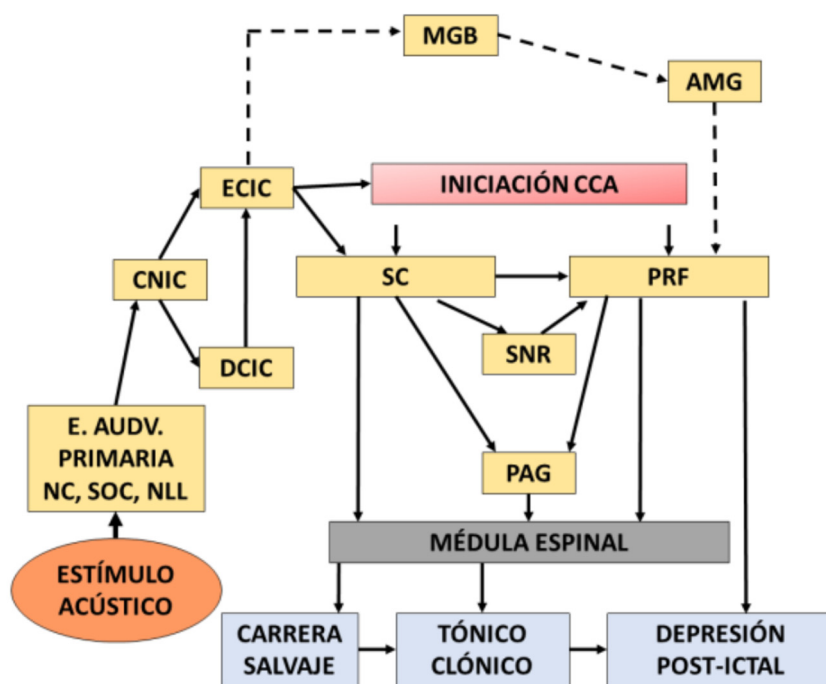


Figura 7. Esquema de las áreas cerebrales más importantes en la génesis de las crisis reflejas audiogénas y comportamientos asociados. AMG: amígdala; CCA: crisis convulsivas audiogénas; CNIC: núcleo central del colículo inferior; DCIC: corteza dorsal del colículo inferior; ECIC: corteza externa del colículo inferior; MGB: cuerpo geniculado medial; NC: núcleo coclear; NLL: núcleos del lemnisco lateral; PAG: sustancia gris periacueductal; PRF: formación reticular del puente; SC: colículo superior; SNR: sustancia negra reticular; SOC: complejo olivar superior. Traducido y adaptado de Faingold et al., (2004).

1.3.2. Modelos animales de estimulación del nervio vago en epilepsia

Los modelos animales han sido claves para el desarrollo de la VNS, demostrando su efectividad y seguridad en su transición hacia la aplicación clínica (Lockard et al., 1990; McLachlan, 1993; Woodbury & Woodbury, 1990; Zabara 1985, 1992). Desde entonces, se ha estudiado la VNS en más de 30 modelos diferentes, mostrando su potencial utilidad en un rango amplio de tipos de epilepsia (Aalbers et al., 2011). Sin embargo, una de las principales razones por la que el mecanismo de acción de la VNS sigue siendo controvertido, es que los diseños experimentales en la mayoría de los estudios animales no han sido capaces de recrear la terapia de una forma lo suficientemente fiel a como se aplica en la clínica.

Así, los modelos animales de VNS en epilepsia disponibles en la literatura presentan una serie de inconvenientes (Aalbers et al., 2011):

- La estimulación suele aplicarse de forma aguda, durante minutos o pocas horas al día mediante estimulación externa. Los estudios crónicos que utilizan un sistema implantable son muy escasos. Este hecho se debe a las dificultades técnicas de realizar un modelo de neuroestimulación relevante con las características idóneas en el laboratorio, especialmente en animales de pequeño tamaño como los roedores (Donahue et al., 2022; Noller et al., 2019).

- El diseño experimental a su vez suele provocar que el animal se encuentre anestesiado o inmóvil. La anestesia deprime el sistema nervioso, afectando múltiples procesos e incluso puede tener efecto anticonvulsivo y hacer que la estimulación eléctrica necesaria para desarrollar un efecto sea menor.
- En algunos casos, incluso se aplican vagotomías, para garantizar una activación únicamente aferente, lo que modifica la propia terapia como tal y afecta a núcleos del tronco del encéfalo.
- La estimulación eléctrica suele aplicarse en un periodo de tiempo muy próximo a la inducción de las crisis y con un único tren de pulsos, lo que podría únicamente simular el efecto del uso del imán cuando los pacientes muestran un aura. No se simula el efecto acumulado de la estimulación cíclica durante periodos largos de tiempo como se observa en pacientes.
- No tienen en cuenta la farmacoresistencia o no de los animales.
- Su uso en animales no epilépticos puede sobreestimar la eficacia de la VNS
- Se utilizan parámetros de estimulación no comparables con la clínica. Este enfoque puede ser correcto para establecer nuevos protocolos de estimulación, pero en muchos casos, estos parámetros se fijan de forma arbitraria y no se comparan con protocolos de estimulación ya probados.

2. Justificación del trabajo

La estimulación del nervio vago (VNS) es una terapia coadyuvante que ha mostrado eficacia clínica en el tratamiento de la epilepsia refractaria. Sin embargo, a pesar de que empezó a utilizarse hace más de 30 años y paulatinamente se ha ido extendiendo su uso, todavía existen muchas áreas de mejora en su aplicación. En sus inicios, la VNS comenzó a utilizarse por su efecto sobre las crisis epilépticas, sin profundizar en los mecanismos de acción subyacentes a esta terapia. Este aspecto, sumado a la heterogeneidad propia de estudios clínicos en los cuales se agrupa a pacientes con diferentes tipos de epilepsia, tiempos de evolución, comorbilidades y tratamientos recibidos, ha provocado que el conocimiento sobre esta terapia no sea tan completo como cabría esperar. Hoy en día, está demostrado que es beneficiosa para los pacientes epilépticos no sólo por su efecto sobre las crisis, sino también por su impacto en otras áreas de la calidad de vida. Además, dada la gran cantidad de conexiones y funciones en las que participa el nervio vago, en los últimos años se está estudiando su posible aplicación en otras enfermedades, entre las que destacan afecciones psiquiátricas e inflamatorias. Por otro lado, los sistemas de VNS disponibles siguen mejorando e incorporando nuevas funcionalidades, incluso modificando los parámetros de estimulación ante variables fisiológicas detectadas por el propio sistema. Asimismo, se está discutiendo la aplicabilidad de protocolos de VNS no invasivos, con el fin de evitar riesgos quirúrgicos, disminuir costes o utilizarse como una herramienta para la selección de pacientes antes de decidirse por un tratamiento crónico de VNS invasivo al uso.

Los modelos animales son una herramienta que puede ayudar a resolver estas cuestiones. Sin embargo, la mayoría de los modelos disponibles actualmente, no permiten recrear esta terapia en condiciones lo suficientemente similares a las de la clínica humana como para poder extraer conclusiones. Estos modelos suelen presentar modificaciones con respecto a la terapia original, como aplicar estimulación aguda, con parámetros arbitrarios que no se corresponden con los utilizados en pacientes, con los animales anestesiados o sin libertad de movimiento o con crisis provocadas mediante estímulos eléctricos o químicos, que pueden interferir en los resultados.

Por todo ello, en experimentos preliminares, se puso a punto el protocolo de VNS en el GASH/Sal utilizando un dispositivo programable e implantable diseñado y comercializado para uso clínico humano, y se observó su efecto anticonvulsivo. En este estudio, se pretende refinar el dispositivo, diseñando un nuevo neuroestimulador adecuado para roedores de laboratorio, ya que, por cuestiones bioéticas, los dispositivos clínicos tienen un tamaño demasiado grande como para ser utilizados en estos animales más allá de una puesta a punto y valoración de la técnica.

En este trabajo, se pretende estudiar el efecto sobre las crisis, conducta y seguridad de la VNS aplicada tanto en el nervio vago izquierdo como en el derecho. Esto obedece a que la VNS se aplicó inicialmente sobre el vago cervical izquierdo, como en la clínica, para evitar posibles efectos secundarios cardiovasculares. No obstante, como hay casos en los que no es posible realizar estimulación del nervio vago izquierdo, se investigó también su aplicación en el vago derecho.

Asimismo, se estudia el efecto combinado de fármacos antiepilépticos (FAE) y VNS en el GASH/Sal, ya que los pacientes que recurren a la VNS han recibido tratamiento con uno o varios FAE durante años, y la VNS no sustituye completamente los FAE utilizados, aunque puede reducir sus dosis y/o número. Conocer las posibles interacciones y sinergias entre FAE y VNS puede dar pistas sobre los mecanismos de acción de las terapias y mejorar la selección de tratamiento para cada paciente.

Para contribuir al estudio de los mecanismos de acción de la VNS, nos hemos centrado en el potencial efecto antiinflamatorio de la técnica. En los últimos años, se ha descrito un reflejo inflamatorio mediado por el nervio vago, y dada la relación entre epilepsia e inflamación, se ha sugerido que, por lo menos parte del efecto anticonvulsivo de la VNS podría radicar en su efecto antiinflamatorio. Por último, este enfoque se ha complementado con estudios inmunohistoquímicos y de electrofisiología, que pretenden caracterizar el efecto de la VNS sobre la actividad cerebral.

Además, durante la realización de esta tesis doctoral, se han obtenido muestras de tejido nervioso, que podrán analizarse mediante técnicas de biología molecular en trabajos futuros, para tratar de aportar más información referente a los mecanismos de acción estudiados.

3. Hipótesis y objetivos

3.1 Hipótesis

La estimulación del nervio vago es una herramienta anticonvulsiva utilizada en la clínica para el control de epilepsias farmacorresistentes, que ha mostrado un efecto similar en algunos modelos experimentales de epilepsia.

La fabricación de un neuroestimulador diseñado para animales de laboratorio, permitirá la realización de estudios crónicos de investigación traslacional destinados a evaluar los efectos y mecanismos de la estimulación del nervio vago (VNS).

La VNS, ya sea aplicada en el nervio vago izquierdo o derecho, debe modular o inhibir las crisis convulsivas del hámster GASH/Sal. El protocolo diseñado no debe mostrar alteraciones significativas no deseadas sobre otras variables fisiológicas. Además, postulamos que la VNS reduce los mecanismos neuroinflamatorios asociados a las crisis convulsivas. Igualmente, la VNS debe producir alteraciones observables en la actividad neuronal.

Finalmente, proponemos que la VNS presentará efectos sinérgicos a los FAE, potenciando su efecto y permitiendo reducir su dosis para inhibir las crisis en nuestro modelo experimental.

3.2 Objetivos

Objetivo general

Estudiar el efecto y el mecanismo de acción de la estimulación del nervio vago (VNS) en el hámster GASH/Sal, como modelo de epilepsia audiógena.

Objetivos específicos

1. Desarrollar un neuroestimulador específicamente diseñado para el animal de laboratorio que permita realizar estudios de VNS crónica.
2. Analizar el efecto anticonvulsivo de la VNS en el hámster GASH/Sal aplicada en el nervio vago izquierdo y derecho, con los parámetros de estimulación empleados en la clínica.
3. Comprobar que los diferentes protocolos de VNS no producen cambios significativos indeseados sobre variables fisiológicas y el comportamiento.
4. Estudiar un posible efecto antiinflamatorio a nivel sistémico y cerebral.

5. Comparar los efectos sinérgicos de VNS y FAE en el hámster GASH/Sal.
6. Determinar las áreas cerebrales activadas por la VNS.

4 Diseño experimental

El esquema general del diseño experimental se muestra en la **Figura 8**. La descripción detallada de cada uno de los procedimientos puede encontrarse en la sección correspondiente en el apartado de Material y métodos.

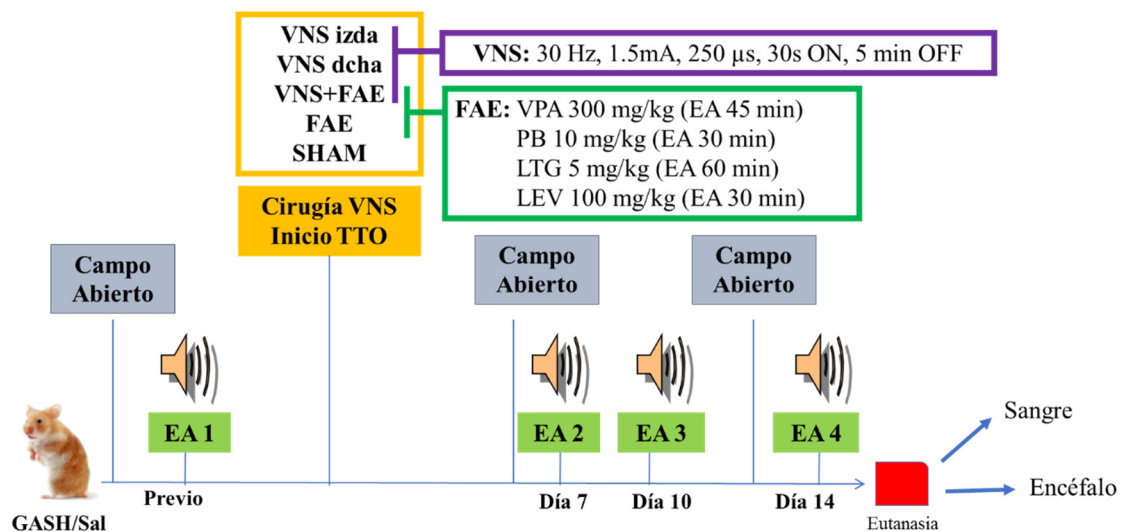


Figura 8. Esquema general del diseño experimental. En primer lugar, se realizó una evaluación inicial del comportamiento de los animales en condiciones basales mediante una prueba de campo abierto. Posteriormente, se realizó un registro en video de las crisis convulsivas producidas por la exposición a un sonido intenso (estimulación auditiva, EA). Tras un periodo de recuperación, los animales comenzaron su tratamiento crónico de 14 días en función del grupo experimental al que pertenecieran, con estimulación vagal (VNS izquierda o derecha), y/o fármacos antiepilépticos (FAE) (ácido valproico, fenobarbital, lamotrigina o levetiracetam). En el caso de los animales tratados con VNS, fue necesaria una cirugía de implantación del sistema de neuroestimulación. Se incluyó, además, un grupo simulado (SHAM), en el que se realizó la misma cirugía, pero el neuroestimulador se implantó apagado. Posteriormente, se expuso nuevamente a los animales a EA tras 7, 10 y 14 días de tratamiento. Los días 7 y 14 de tratamiento, se repitió la prueba de campo abierto, antes de la evaluación de las crisis. 60 minutos después del último registro de las crisis convulsivas, se procedió a la eutanasia y extracción de muestras de sangre y tejido nervioso. Durante la eutanasia, se verificó visualmente la correcta colocación del electrodo de estimulación y la ausencia de fibrosis. Las muestras se destinaron al análisis de marcadores inflamatorios, estudios histológicos y a la determinación de parámetros hematológicos y bioquímicos.

El diseño experimental el mismo en todos los grupos, con las siguientes salvedades:

- En dos animales en los que se realizaron registros electrofisiológicos del nervio vago, fue necesaria además una cirugía estereotáctica para la colocación de un casco de registro para la conexión de los electrodos.
- En el caso de animales tratados con FAE, se extrajeron muestras de sangre de la vena cava craneal los días 11 y 12 de tratamiento para determinar la concentración del principio activo de cada fármaco a diferentes tiempos.

Además, la prueba de campo abierto en estos grupos se realizó los días 6 y 13 de tratamiento, para que los niveles en sangre de los FAE durante la prueba fueran similares a aquellos obtenidos durante el registro de las crisis. Por otro lado, la provocación de las crisis de los GASH se realizó a diferentes tiempos tras la administración del fármaco en función de su cinética de absorción.

- Para los experimentos de inmunohistoquímica, la eutanasia se realizó 3 horas después del último registro de las crisis. Se añadió un subgrupo experimental en el que la eutanasia se realizó 72 horas después de ese último registro. Además, se añadieron varios grupos control: GASH sin ningún tipo de manipulación, GASH con registro de crisis 3 horas antes de la eutanasia, y GASH con registro de crisis 72 horas antes.
- En tres animales, se extrajo, además, cranealmente al electrodo de estimulación, el nervio vago estimulado y el no estimulado de los animales para realizar estudios histológicos.

5. Material y métodos

5.1 Animales de experimentación

Se utilizaron un total de 96 hámsteres sirios (*Mesocricetus auratus*), de entre 2 y 6 meses de edad, de la línea GASH/Sal. Los animales utilizados pertenecían a la colonia mantenida en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los experimentos se realizaron en los laboratorios de Cirugía Experimental de la Facultad de Medicina de la USAL y en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices nacionales (RD 1201/05) y europeas (2010/63/EU) para el uso de animales de laboratorio. Los procedimientos mencionados fueron aprobados por el comité de bioética de la USAL (solicitudes 327 y 942). Se trató de reducir el número de animales utilizados y, en la medida de lo posible, de evitar el sufrimiento de los animales. Todos los experimentos del mismo tipo se realizaron a una misma hora del día para evitar la posible influencia de ritmos circadianos.

Se establecieron los siguientes grupos experimentales:

- Grupo 1. Estimulación del nervio vago izquierdo (VNS) (n=21)
- Grupo 2. Estimulación del nervio vago simulada (SHAM) (n=10)
- Grupo 3. Estimulación del nervio vago derecho (rVNS) (n=7)
- Grupo 4. Ácido valproico (VPA) (n=6)
- Grupo 5. Fenobarbital (PB) (n=6)
- Grupo 6. Lamotrigina (LTG) (n=6)
- Grupo 7. Levetiracetam (LEV) (n=6)
- Grupo 8. VNS+VPA (n=6)
- Grupo 9. VNS+PB (n=6)
- Grupo 10. VNS+LTG (n=6)

- Grupo 11. VNS+LEV (n=6)
- Grupo 12. VNS. Registro del nervio vago (n=2)
- Grupo 13. Controles GASH/Sal para estudio de inmunohistoquímica (n =7)

5.2 Sistemas de estimulación del nervio vago y parámetros utilizados

En las primeras etapas de desarrollo de la tesis doctoral y en el trabajo de fin de Máster realizado anteriormente, en el que se hizo la puesta a punto del procedimiento, se utilizó un sistema de estimulación clínico cedido por LivaNova (Model 104 VNS Therapy Demipulse Duo Generator, Cyberonics, Estados Unidos). El generador de pulsos es de titanio y tiene un peso de 18 gramos y mide 45mm x 39mm x 6,9 mm. Contiene un cabezal de poliuretano termoplástico con dos contactos de acero que permiten insertar y fijar los extremos del electrodo con sendos tornillos. Dispone de una batería con una vida media de 6 años. Además, se utilizó el programador asociado para controlar los niveles de batería, impedancia y el funcionamiento general del sistema (VNS Therapy v8.1 software, DELL AXIM X50 Programming Wand Model 201 Cyberonics, Estados Unidos). Dicho sistema se utilizó en 13 animales del grupo de animales tratados con VNS izquierda y 4 del SHAM.

Posteriormente, se desarrolló un sistema de VNS de menor tamaño, de fabricación propia, en colaboración con el Grupo de Investigación en Bioinformática, Sistemas Informáticos Inteligentes y Tecnología Educativa (BISITE) de la USAL. Este sistema fue utilizado en el resto de los sujetos experimentales. El sistema final diseñado consta de una placa base circular de 20 mm de diámetro y 3,2 mm de grosor. Bajo la placa, se conecta una pila de botón de 3V (CR2012), que le confiere al sistema una capacidad de 55 mAh y una duración de batería de 398 días (Canal-Alonso et al., 2022).

Para la utilización de este sistema, una vez soldados los contactos del electrodo a la placa, se introduce el sistema en una carcasa conformada por dos tapas obtenidas mediante impresión 3D y fabricadas a partir de resina biocompatible (BioMed Durable Resin, Formlabs, Estados Unidos). Además, entre las juntas de la carcasa, por el orificio por el que salen los cables del electrodo, se aplica polidimetilxilosano (PMDS) (Sylgard™ 184 Silicone Elastomer Kit, Dow, Estados Unidos). Finalmente, se elaboró manualmente una capa de aislamiento externo adicional con este mismo material. El sistema de neuroestimulación completamente ensamblado tiene un peso entre 6 y 9 gramos, y varía según el grosor de la capa de aislamiento utilizada, con unas dimensiones medias de 30 mm x 30 mm x 7 mm.

En el caso de ambos sistemas de estimulación, se utilizaron electrodos de platino/iridio diseñados específicamente para el tamaño del vago cervical del hámster (Microprobes for Life Science, Estados Unidos). Inicialmente, los contactos del electrodo de estimulación estaban formados por dos anillos de 25 μ m, tenían un diámetro interno de 200 μ m, y los cables tenían una extensión de 15 cm. Posteriormente, se optimizó el diseño y se utilizaron electrodos con mayor grosor y con un cable más corto, para

facilitar su implantación. En este caso, los contactos estaban formados por dos anillos de 50 μm , con un diámetro interno de 500 μm , y una longitud del cable de 7 cm.

En la **Figura 9** se muestran los sistemas de estimulación del nervio vago y electrodos de estimulación empleados en este trabajo.

Se utilizaron los siguientes parámetros de estimulación: 30 Hz, 1.5 mA, ancho de pulso 250 μs , ciclos 30s ON y 5 min OFF. Se usaron estos parámetros porque ya habían sido utilizados tanto en investigación en modelos animales como en la clínica (Thompson et al., 2021), y porque ya mostraron un efecto anticonvulsivo en un estudio preliminar previo de puesta a punto (Gonçalves Estella et al., 2018).

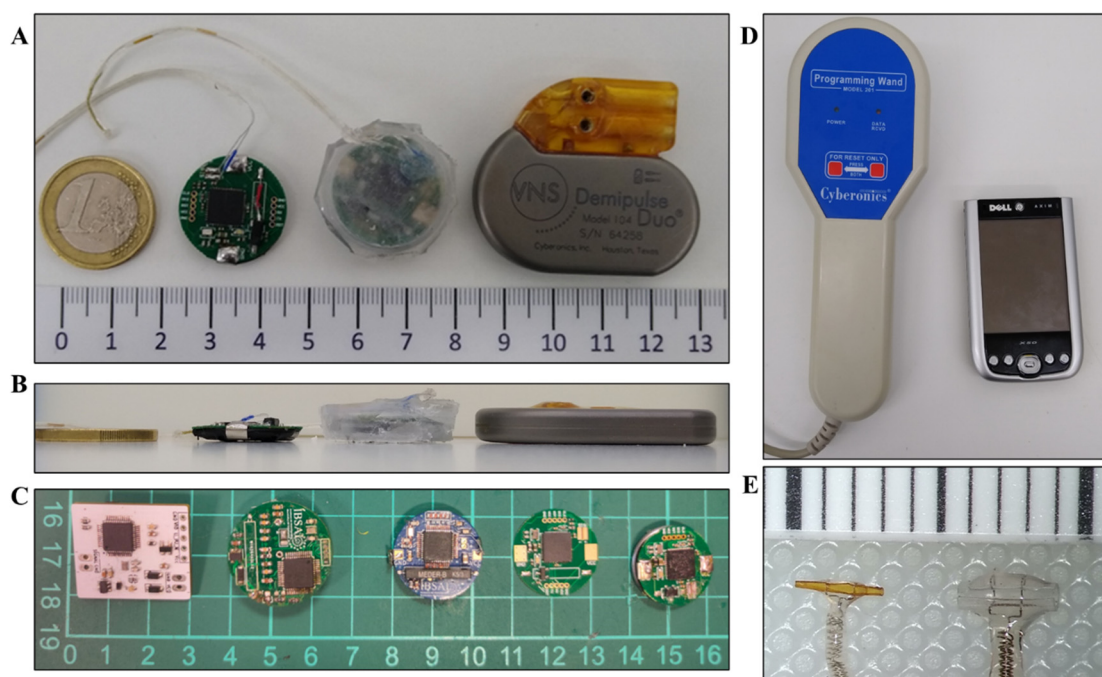


Figura 9. Fotografías de los sistemas de VNS utilizados durante el estudio desde una vista cenital (A) y frontal (B). A la izquierda, sistema VNS diseñado sin aislamiento. Justo al lado, mismo sistema ya aislado, listo para implantar. A la derecha, generador de pulsos clínico. C. Diferentes versiones de la placa base del sistema de VNS diseñado, en las que se aprecia una disminución del tamaño. D. Sistema de programación para la monitorización del dispositivo clínico. E. Detalle de los electrodos de estimulación usados. Primer modelo, a la izquierda. A la derecha, se muestra el segundo.

5.3 Protocolo quirúrgico

Las cirugías de implantación del sistema de VNS se realizaron en el “Laboratorio de Cirugía Experimental María José Sánchez Ledesma” de la Facultad de Medicina de la USAL (**Figura 10**). Los protocolos quirúrgicos se efectuaron en condiciones asépticas bajo anestesia inhalatoria con sevoflurano al 4%, 1L/min O₂ para la inducción y al 3%, 1L/min O₂ para el mantenimiento (Forane, Abbot Laboratories, Estados Unidos).

La asepsia se garantizó mediante la inmersión de los sistemas de estimulación, y todo el instrumental utilizado, en una solución desinfectante de alto nivel para material médico-

quirúrgico (Anioxyde 1000, Laboratoires ANIOS, Francia), justo antes de realizar la cirugía durante, al menos, 10 minutos.

Tras comprobar la ausencia de reflejos, se eliminó el exceso de pelaje de la región cervical anterior y el dorso de los animales. Se colocó a los animales en decúbito supino bajo la lupa quirúrgica (Karl Kaps, Alemania) y se practicó una incisión en la región anterolateral cervical próxima a la línea media. A continuación, se realizó el aislamiento del nervio vago cervical a estimular, izquierdo o derecho, para la cual se realizó disección roma en la intersección de los músculos esternocleidomastoideo y esternohioideo. Esto permitió la exposición de la arteria carótida, próxima al nervio vago. Para facilitar el aislamiento del nervio, se colocó a su alrededor un microparche obtenido de un material de guante estéril. A continuación, se colocó al animal en decúbito prono, y tras realizar otra pequeña incisión en la parte posterior del cuello del animal, se tunelizó el electrodo al campo quirúrgico anterolateral cervical. Posteriormente, se ancló el electrodo de estimulación al nervio vago utilizando suturas no absorbibles.

El extremo del electrodo tiene forma de “T”, con un cilindro de silicona que alberga un contacto en cada extremo y que posee una apertura lateral para poder introducir el nervio. La fijación del electrodo se realizó de dos maneras. En el caso de los primeros electrodos utilizados, más estrechos, una vez introducido el nervio en la vaina del electrodo, y comprobando el correcto contacto del electrodo rodeando con su vaina al nervio en un arco de unos 270°, se empleó un pequeño parche de goma de guante estéril envolviendo completamente la vaina del electrodo con el nervio en su interior dando un punto de sutura tipo “bolsa de tabaco” alrededor de la “T” sin estrangular la zona proximal del electrodo, de manera que el parche rodeara el nervio sin comprimirlo. Por otro lado, en el caso de los electrodos más gruesos, dada la existencia de mayor margen para colocar el electrodo, se aplicaron dos puntos simples en la parte más superficial de la propia carcasa cilíndrica del electrodo sin dañar los contactos. En ambos casos, se comprobó que el electrodo estaba correctamente anclado al nervio sin ejercer una tensión excesiva ni dañarlo y orientado correctamente con el polo positivo en situación caudal y el negativo en situación cefálica.

Finalmente, en la incisión practicada en el dorso, se fabricó un bolsillo subcutáneo mediante disección roma para la implantación del generador de pulsos. Después, se procedió a cerrar ambas incisiones aplicando puntos simples. Tras la intervención quirúrgica, los animales tuvieron un periodo de recuperación con agua y alimento “ad libitum” en jaulas individuales y recibieron buprenorfina (0,5 mg/kg) por vía subcutánea como analgesia postoperatoria durante los tres primeros días. Durante todo el procedimiento, se aplicó suero fisiológico de forma periódica para evitar la desecación ocular del animal, y se utilizó una manta térmica para evitar la pérdida de temperatura.

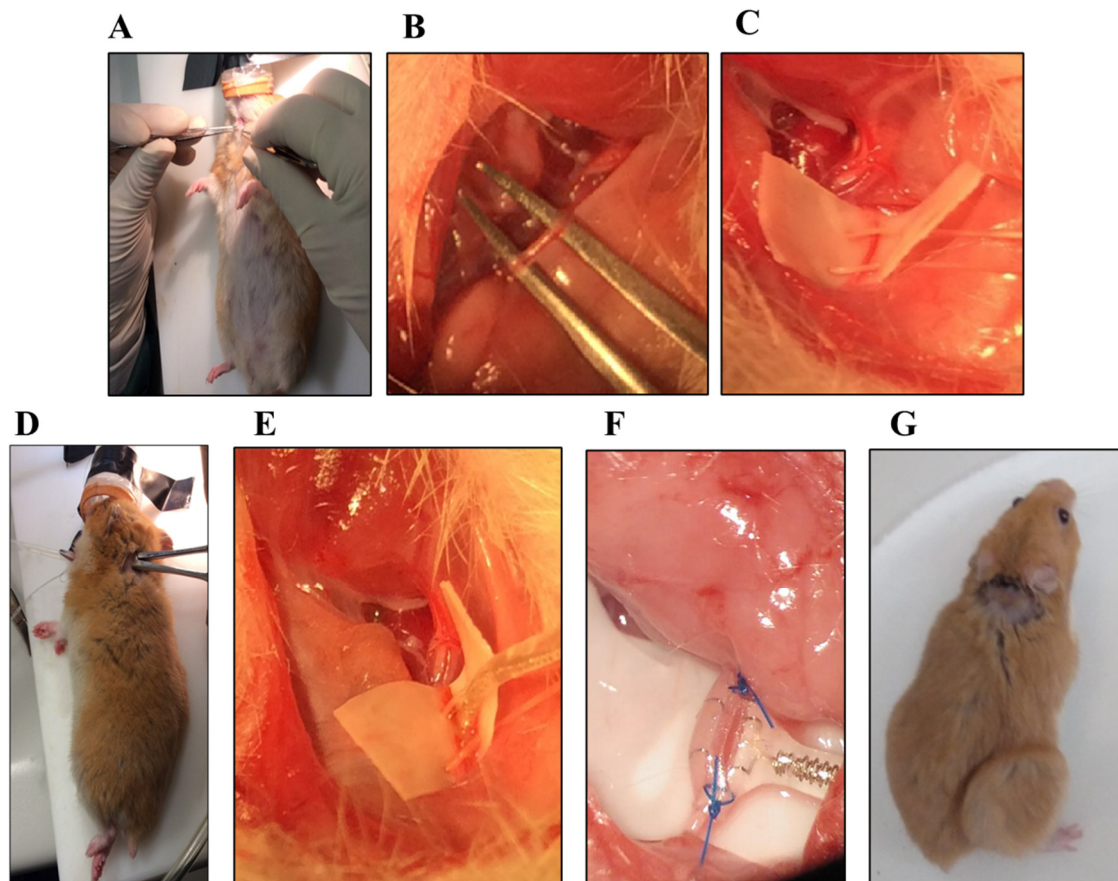


Figura 10. Cirugía de implantación de los sistemas de VNS. A. Abordaje de la región cervical anterolateral izquierda. B. Disección del nervio vago. C. Colocación del microparche e hilo de sutura bajo las que se fija el electrodo de estimulación. D. Tunelización del electrodo a través del dorso del animal. E. Implantación del electrodo de estimulación (punto en C sobre el microparche estéril). F. Implantación del electrodo de estimulación (dos puntos simples en la carcasa del electrodo). G. GASH/Sal tras la cirugía. Generador de pulsos implantado en la parte posterior del dorso.

5.4 Fármacos antiepilépticos

5.4.1 *Dosis y administración*

Se administraron una vez al día, durante 14 días, y por vía intraperitoneal, cada uno de los siguientes fármacos, de manera aislada y en combinación con VNS:

- Ácido valproico (VPA). (*Depakine®*). Solución inyectable. Dosis: 300 mg/kg
- Fenobarbital (PB) (*Luminal®, Kern Pharma*). Solución inyectable. Dosis: 10 mg/kg.
- Lamotrigina (LTG) (*Lamotrigine J10032, AKScientific*) Dosis: 5 mg/kg
- Levetiracetam (LEV) (*Hospira*). Solución inyectable. Dosis: 100 mg/kg.

Los FAE se diluyeron en suero fisiológico para tener más precisión en la inyección de la dosis deseada debido al bajo peso de los animales. La lamotrigina fue previamente disuelta en DMSO (2 mg/ml).

5.4.2 *Evaluación de los niveles de fármacos en sangre*

Para el estudio de la cinética de absorción de cada uno de los FAE, se realizaron extracciones de un volumen aproximado de sangre de 100-150 µl los días 11 y 12 de tratamiento mediante la punción de la vena cava craneal (Picazo et al., 2009). El procedimiento se realizó bajo anestesia inhalatoria con sevoflurano y se rehidrató a los animales con una cantidad equivalente de suero salino. Después de la formación del coágulo, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 rpm, para la obtención de suero. Dichas muestras fueron analizadas por HPLC/MS por el Servicio de cromatografía y espectrografía de masas de la Universidad de Salamanca para poder obtener la correspondiente curva de concentraciones plasmáticas.

Se extrajeron muestras a diferentes tiempos tras la inyección de FAE:

- 5, 30, 90, 120 y 300 minutos para el grupo tratado con VPA
- 5, 10, 20 y 30 para PB
- 15, 30, 45, 90, 180 y 360 para LTG
- 15, 30, 60, 120 y 240 para LEV

5.5 Estímulo acústico. Registro de las crisis convulsivas

Los animales se colocaron en un cilindro transparente de 37cm de diámetro, donde se les permitió explorar y adaptarse al entorno durante un minuto. A continuación, se provocaron las crisis convulsivas mediante la estimulación acústica, con un sonido semialeatorio de 0-18 kHz de frecuencia y 115-120dB SPL de intensidad, reproducido por un ordenador que tiene acoplado un amplificador (Frahm Slim 1000, Brasil) y un altavoz de altas frecuencias (JBL ST200, Estados Unidos), sonido que dura hasta el comienzo de las convulsiones tónico-clónicas o hasta un máximo de un minuto.

La respuesta de los animales a la estimulación sonora, así como los periodos previos de exploración y los periodos post-ictales, se grabaron en vídeo con una cámara fija (goPro Hero +) desde una posición frontal. Este registro se realizó antes del inicio del tratamiento, y tras 7, 10 y 14 días. En aquellos animales en los que no se observó conducta epileptógena alguna, el registro se mantuvo únicamente durante un minuto tras la exposición al sonido. En el resto de los casos, el registro post-ictal duró tres minutos.

En los animales de grupos experimentales tratados con FAE, se realizó el registro de las crisis a diferentes tiempos tras su administración en función de la cinética de los fármacos:

- VPA: 45 minutos
- PB: 30 minutos
- LTG: 60 minutos
- LEV: 30 minutos

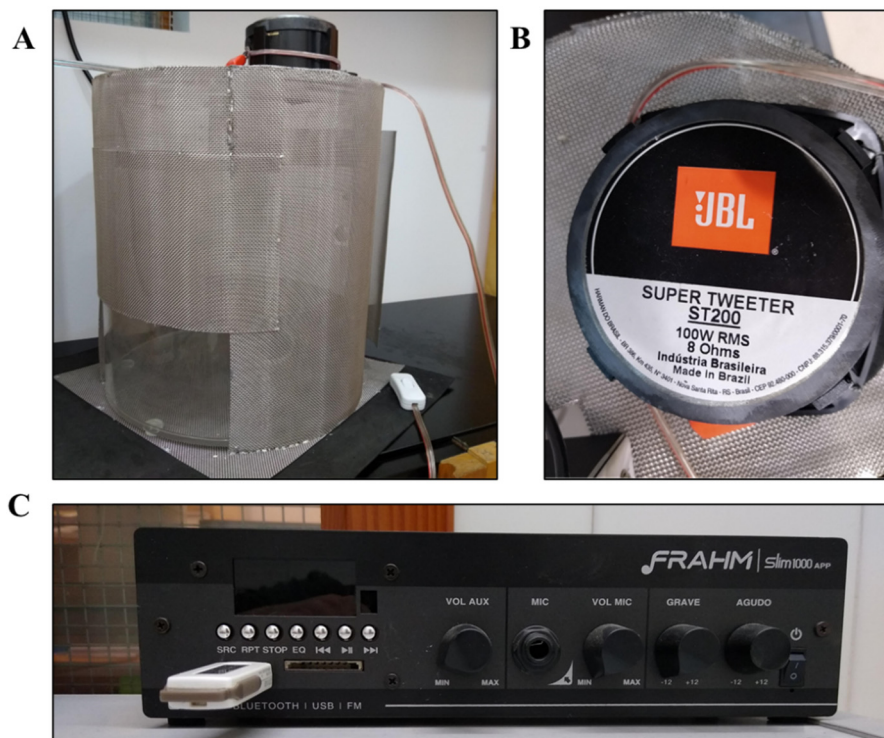


Figura 11. Sistema de registro de las crisis convulsivas. A. Cilindro de registro. B. Altavoz. C. Amplificador del sonido.

5.6 Estudio neuroetológico de las crisis convulsivas

La evaluación del efecto anticonvulsivo de los diferentes tratamientos se llevó a cabo según los valores del índice de severidad categorizado (cSI) (Garcia-Cairasco et al., 1996) (**Tabla 2**). El índice cSI se trata de una escala entre 0 y 8 que transforma las conductas observadas en variables discretas para facilitar la realización de análisis estadísticos. Además, se anotaron la latencia de las crisis convulsivas y/o de las convulsiones tónico-clónicas en aquellos animales que las presentaron.

Los registros en vídeo de las crisis convulsivas del GASH/Sal se analizaron con el software Ethomatic (Garcia-Cairasco et al., 1992, 2004), distinguiendo 3 ventanas diferentes, en el periodo previo de exploración, el momento de la exposición al sonido y el comportamiento tras el estímulo acústico. Con los datos obtenidos y utilizando Microsoft Power Point 365, se elaboraron los diagramas de flujo o etogramas característicos de cada grupo experimental (**Figura 5**). Para realizar los análisis, se observó detenidamente cada uno de los registros en vídeo, y, deteniéndose segundo por segundo, se asignaron las conductas al sujeto experimental analizado. Estas conductas están recogidas en un diccionario de comportamientos que, en el caso de este trabajo, se compone de 41 ítems diferentes. (**Tabla 3**). Para la representación de los etogramas, se separó a los GASH/Sal que no mostraron conducta epileptógena alguna (cSI = 0), del resto.

Tabla 2. Valores del índice de severidad categorizado (cSI).

Conductas	cSI
Ausencia de carrera	0
Una carrera salvaje	1
Una carrera salvaje, seguida de saltos y caídas atónica	2
Dos carreras salvajes, seguidas de saltos y caídas atónicas	3
[cSI = 3] más convulsión tónica con arqueamiento del dorso (opistótono)	4
[cSI = 4] seguido por convulsiones clónicas	5
[cSI = 5] y flexión ventral de la cabeza	6
[cSI = 6] e hiperextensión de las patas anteriores ^a	7
[cSI = 7] e hiperextensión de las patas posteriores ^a	8
^a Categorías, en las que suelen producirse convulsiones clónicas de las patas posteriores	

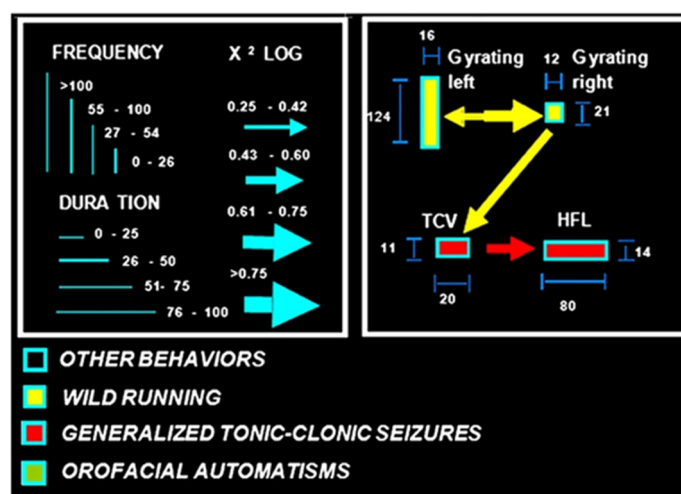


Figura 12. Funcionamiento del software Ethomatic. Tras construir los etogramas, cada uno de los comportamientos que aparecen en el análisis se muestra como un rectángulo. La base del rectángulo se corresponde con la duración media del comportamiento analizado, y su altura se relaciona con el valor absoluto de la frecuencia de dicho comportamiento. Cada par de comportamientos o diada puede estar unido unidireccional o bidireccionalmente entre sí por flechas o no, cuya anchura se corresponde con el logaritmo de los valores de χ^2 . Estos valores determinan la significación estadística de la asociación entre esos comportamientos. El sentido de cada flecha viene dado por la dirección preferente de asociación de los comportamientos, es decir, por el orden en el que esa asociación es significativa. Además, cada uno de los comportamientos se muestra de un determinado color: los comportamientos exploratorios y post-ictales se muestran en azul, los de carrera salvaje en amarillo, los convulsivos en rojo y los automatismos orofaciales en verde. Cada grupo de comportamiento puede englobarse a su vez, dentro de clústeres, que se representan mediante círculos de mayor tamaño y que incluyen comportamientos relacionados que se agrupan.

Tabla 3. Diccionario de comportamientos utilizado para la elaboración de los etogramas.

Abreviatura	Descripción	Abreviatura	Descripción
AF	Caída atónica	HFL	Flexión ventral de la cabeza
BE	Guiñar el ojo	HP1	Hiperextensión de las patas anteriores
CCV1	Convulsiones clónicas (patas anteriores)	HP2	Hiperextensión de las patas posteriores
CCV2	Convulsiones clónicas (patas posteriores)	IM	Inmóvil
CCVg	Convulsiones clónicas (generalizadas)	JP	Saltar
CCVp	Convulsiones clónicas (parciales)	LI	Lamer
CVL1	Convulsiones clónicas (pata anterior izquierda)	LIC	Limpieza de las garras
CVL2	Convulsiones clónicas (pata posterior izquierda)	MT	Masticar
CVR1	Convulsiones clónicas (pata anterior derecha)	PIM	Inmovilidad postictal
CVR2	Convulsiones clónicas (pata posterior derecha)	RU	Correr
DYS	Disnea	SC	Escudriñar
ER	Erecto	SCRL	Rascar lado izquierdo
EXC	Excretar	SCRR	Rascar lado derecho
GL	Girar hacia la izquierda (sentido antihorario)	SN	Oler exploratorio
GN	Roer	STA	Sobresalto
GR	Girar hacia la derecha (sentido horario)	STR	Enderezamiento
GRF	Acicalamiento del hocico	TCP	Taquipnea
GRG	Acicalamiento de los genitales	TCV	Convulsión tónica
GRH	Acicalamiento de la cabeza	VOC	Vocalización
GRL	Acicalamiento (parte izquierda del cuerpo)	WA	Caminar
GRR	Acicalamiento (parte derecha del cuerpo)		

5.7 Evaluación de los cambios comportamentales

Se efectuó una prueba de campo abierto antes del experimento y tras 7 y 14 días de tratamiento (días 6 y 13 para los GASH tratados con FAE). Para ello, se dejó explorar libremente a los animales durante 12 minutos en un recinto circular blanco de 80 cm de diámetro dividido en tres áreas concéntricas y delimitado por una pared de 30 cm de alto. Todo el procedimiento fue grabado en vídeo por una cámara (Xiaomi Mi Action Camera 4k) en posición cenital. Se utilizó el software ANY-MAZE (Stoelting Co, v 6.16, Estados Unidos) para el procesamiento y análisis de los datos: distancia recorrida, tiempo que los animales se encuentran inmóviles, tiempo y entradas en la zona central, acicalamiento y elevaciones. (**Figura 13**).

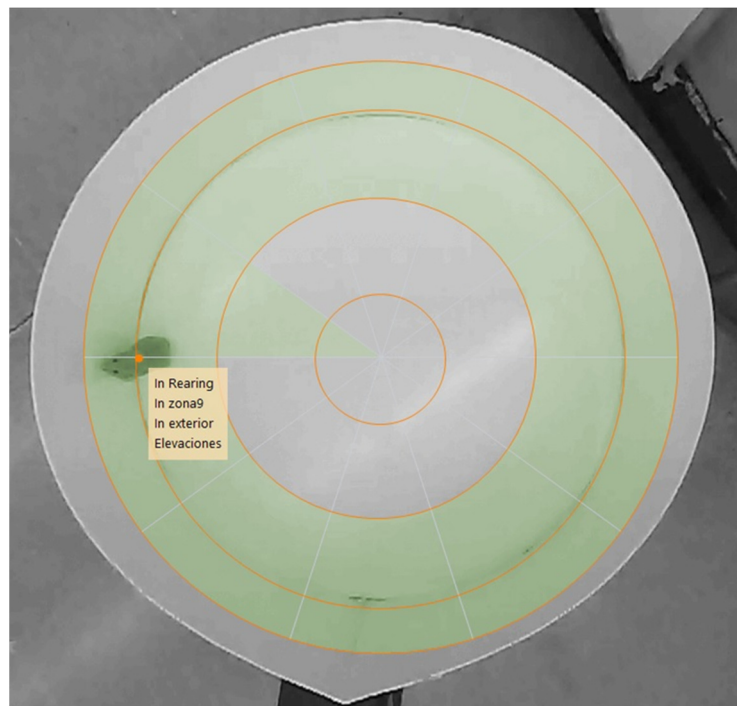


Figura 13. Prueba de campo abierto. Recinto y software utilizados. Captura de pantalla del análisis de una prueba con el programa ANY-MAZE.

5.8 Evaluación del estado general

Se realizó un análisis de hemograma al finalizar el experimento, evaluando los siguientes parámetros: hemoglobina, hematocrito y conteo de glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas. La lectura se llevó a cabo en un citómetro ADVIA 120 (Bayer, Alemania).

Además, se determinó la concentración de proteína total, bilirrubina, albúmina, aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa en muestras de suero. Para ello, se utilizaron kits comerciales de tiras de bioquímica seca (Spotchem II Liver-1 kit, #33925, Menarini Diagnostic, España). El equipo empleado fue un analizador Spotchem

EZ SP-4430 (Arkray, Japón). Ambos análisis se llevaron a cabo en el Servicio de Experimentación Animal de la USAL.

Como parámetros de referencia para evaluar los efectos del tratamiento en comparación con la situación basal, se tomaron los valores del libro “Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio” (Martín et al., 2008), salvo los niveles de plaquetas, que, por investigaciones previas de nuestro grupo, conocemos que difieren de lo reflejado en este libro y se sitúan alrededor de las 1300 por microlitro (Cabral-Pereira et al., 2021).

En el caso de grupos tratados con FAE, se evaluó la posible sedación según el índice SdI propuesto por Lösher y Hönack (1989) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Valores del índice de sedación (SdI).

Conductas	SdI
Locomoción ligeramente reducida	1
Locomoción reducida con periodos de descanso	2
Locomoción reducida con más periodos de descanso	3
No hay locomoción, el animal esta inmóvil con los ojos cerrados	4

5.9 Registros electroneurofisiológicos

Se realizó un registro electrofisiológico del nervio vago cervical izquierdo en 2 GASH/Sal. Este experimento se planteó con el objetivo de demostrar que la cirugía y el tratamiento no dañan el nervio, a la vez que permitió observar el tren de pulsos eléctricos generado.

En estos sujetos experimentales, en la misma cirugía en la que se implantó el sistema de VNS, se colocó un electrodo de registro, inmediatamente craneal al electrodo de estimulación. El electrodo de registro es de fabricación propia y está compuesto por un tubo de polietileno PE50 (IntramedicTM Clay Adams Brand, Becton Dickinson and Company, Estados Unidos), en el que se hace un pequeño corte y se realizan dos hendiduras por las que se introduce una pequeña zona previamente pelada de un cable de acero inoxidable de 76 mm de diámetro recubierto con teflón (PFA-Coted Stainless Steel Wire #7909, A-M Systems, Estados Unidos). Después, se le aplica silicona odontológica (Hydrosilicone Fast Putty Soft, KDM, Madespa S.A., España) y se trenza el cable para evitar su desplazamiento. El electrodo se fijó de forma similar al electrodo de estimulación, aplicando puntos de sutura, en este caso, sobre la silicona odontológica.

Posteriormente, se rasuró la cabeza de los hámsteres y se practicó una incisión para exponer el cráneo. A continuación, se tunelizó el electrodo de registro desde la región

anterolateral izquierda hacia la incisión del cráneo. Después, se colocó a los animales en un marco estereotáctico (David Kopf Instruments, Estados Unidos), manteniendo la anestesia inhalatoria gracias a una máscara diseñada mediante impresión 3D. Tras exponer el cráneo, se implantó un electrodo de tierra en el hueso frontal derecho. Este electrodo está formado por un cable de cobre soldado a un microtornillo de 2 mm de diámetro (M1.4x5.7) (CentroStyle, Italia). Además, se implantaron otros dos tornillos adicionales en la calota para facilitar la colocación de un casco de registro. Finalmente, se soldaron los contactos del electrodo de registro y del electrodo de referencia a un conector RJ11 de 4 pines y se cubrieron todos los cables conacrílico dental (Henry Schein, Estados Unidos).

Para realizar los registros, se introdujeron los animales en una jaula de Faraday y se les conectó a través de la clavija del casco a un amplificador, que a su vez se encontraba conectado a un sistema PowerLab 4/20. Se utilizó el software LabChart (AD Instruments, Nueva Zelanda) para la obtención de la señal, con una tasa de muestreo de 10 kHz. Se obtuvo una grabación de vídeo simultáneo con una webcam Logitech C925e. Matlab R2022b (MathWorks, Estados Unidos), que se empleó para analizar los datos obtenidos. En este caso, se aplicó un filtro de paso alto de 5 Hz que permitió eliminar oscilaciones de gran amplitud y baja frecuencia.

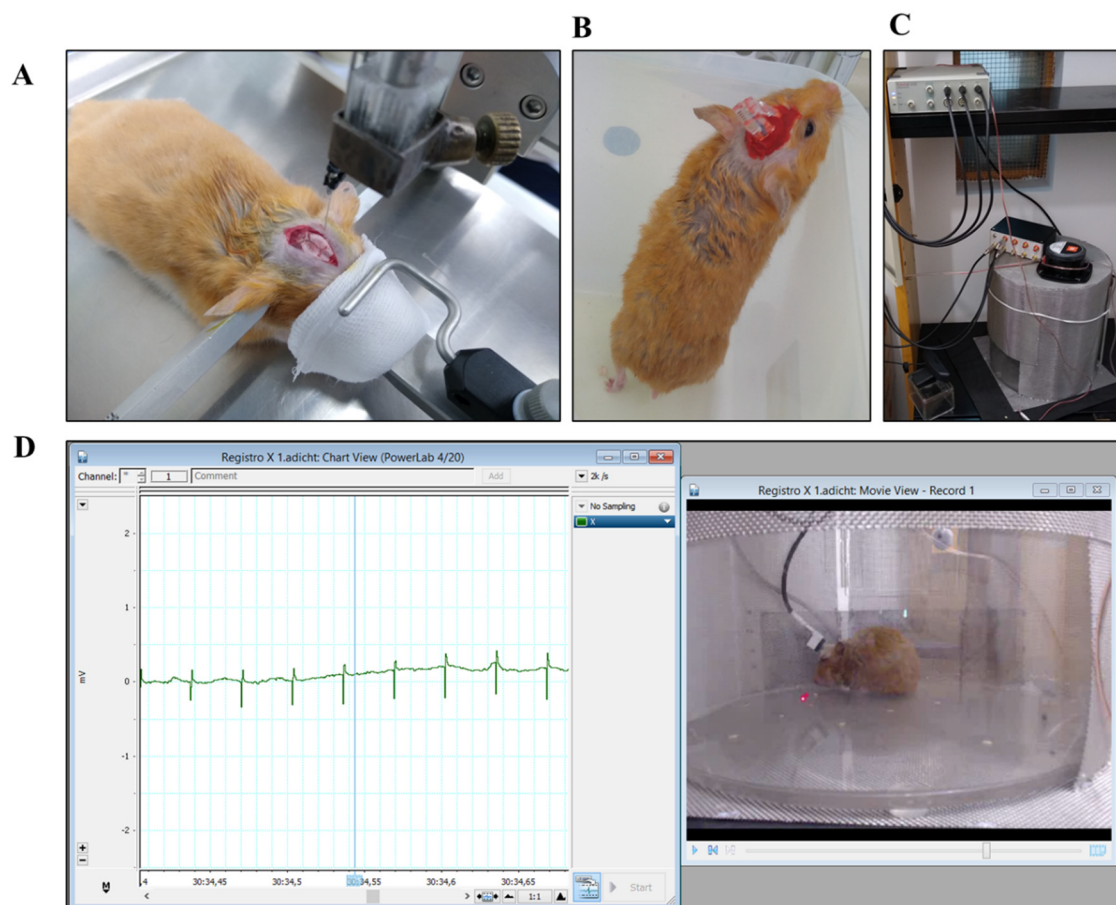


Figura 14. Registros electrofisiológicos en el GASH/Sal. A. Cirugía estereotáctica en el GASH/Sal. **B.** GASH/Sal con casco de registro implantado. **C.** Sistema de registro utilizado. **D.** Captura del software Labchart.

5.10 Extracción y procesamiento de muestras

5.10.1 *Extracción y procesamiento de las muestras sanguíneas*

Al finalizar los experimentos, se indujo la sedación de los animales mediante anestesia inhalatoria con sevoflurano. Tras comprobar la colocación correcta del electrodo de estimulación, se extrajeron muestras de sangre mediante punción cardíaca.

- Una parte fue transferida a tubos con EDTA, para el análisis del hemograma y/o de marcadores inflamatorios. En este último caso, fue necesaria la obtención de plasma, mediante centrifugación a 4500 rpm durante 20 minutos.
- Por otro lado, se reservaron unos 400 µl de muestra aproximadamente sin sustancias anticoagulantes para la obtención de suero, con el objetivo de analizar parámetros bioquímicos. Se dejó reposar la sangre durante 30 minutos, y después se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm.

En todos los casos, las muestras se mantuvieron a -70°C hasta su estudio.

5.10.2 *Extracción y procesamiento de tejido nervioso*

Tras la retirada del sistema de VNS y la extracción de sangre, se realizó la decapitación de los animales y se extrajo el encéfalo. Las muestras, igual que en el caso anterior, se congelaron a -70°C hasta su utilización.

En los casos en los que se realizaron estudios de inmunohistoquímica, se realizó un protocolo de perfusión transcardíaca. Para ello, tras anestesiar a los animales con pentobarbital sódico (60 mg/kg, intraperitoneal), se expuso la cavidad torácica. A continuación, se practicó una incisión en el ventrículo derecho por la que se introdujo una cánula en la aorta. Inmediatamente, tras realizar un corte en la aurícula derecha, se perfundió primero a los GASH/Sal con suero Ringer para el lavado de vasos (pH 6,9, 37°C) y posteriormente con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M (pH 7,4).

A continuación, se decapitó a los animales y se extrajo el encéfalo. Se introdujo un pequeño alfiler en el lado izquierdo para determinar la lateralidad de las secciones en los siguientes estudios. Después, los cerebros fueron sumergidos en sacarosa al 30% en PB 0,1M durante 48 horas con ligera agitación. Tras retirar el alfiler y cortar los cerebros por la mitad con una cuchilla, se sumergieron en isopentano previamente enfriado con hielo seco durante unos segundos. Finalmente, las muestras obtenidas se mantuvieron a -20°C.

Para su procesamiento, los cerebros se cortaron en secciones coronales de 40 µm de grosor en un microtomo de congelación (HM Microm Heidelberg, Alemania). Se utilizó una pequeña cantidad de sacarosa para fijar la pieza en el soporte y hielo seco para evitar la descongelación y degradación del tejido. Los cortes se recogieron en series de 10 pocillos por cerebro en tampón fosfato 0,1 M.

Por otra parte, en los animales en los que se realizó la extracción del nervio vago estimulado y del no manipulado, ésta se practicó en una posición craneal al electrodo de VNS. Las muestras obtenidas se sumergieron en paraformaldehído al 4% y se conservaron a 4°C. Posteriormente, las preparaciones histológicas se incluyeron en parafina y se cortaron en un microrotomo HM Microm 310, realizándose cortes transversales de 7 µm de grosor.

5.11 Estudio de la expresión de marcadores inflamatorios

5.11.1 *ELISA*

Se evaluó mediante inmunoensayo ELISA la expresión de IL-1β en plasma, corteza, cerebelo y tronco del encéfalo con un kit comercial (Mouse IL-beta/IL-1F2 Quantikine ELISA kit, R&D Systems, Estados Unidos).

Para la extracción de proteínas, se pesaron las muestras de tejido. A continuación, se les añadió tampón de lisis (RIPA Buffer #9806, Cell Signaling Technology, Estados Unidos) con inhibidores de proteasas (Protease/phosphatase inhibitor cocktail #5872, Cell Signaling Technology, Estados Unidos; PMSF 36978, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) según la relación 1 mL de tampón por 100 mg de tejido. Las muestras se homogenizaron mecánicamente (IKA T10 basic Ultra Turrax Homogenizer Workcenter, IKA, Alemania), trabajando en frío, para evitar la degradación del tejido. Una vez centrifugadas a 14000 rpm y 4°C durante 15 minutos, se recogió el sobrenadante y las muestras se almacenaron hasta su utilización a -70°C. Para la realización del ELISA, se siguieron las instrucciones del fabricante. Cada muestra se analizó por triplicado. La obtención de la señal se realizó en un espectrofotómetro (Multiskan Ascent 354, Thermo Electron, Estados Unidos) con el software Ascent v.2.6., verificándose la linealidad de la recta de calibración.

5.11.2 *Matrices de marcadores inflamatorios*

Se evaluó la expresión de 23 marcadores inflamatorios en muestras de plasma y en el hemisferio cerebral izquierdo de GASH/Sal tratados con VNS izquierda y del grupo SHAM. Para ello, se utilizó un kit comercial (Mouse Neuro Antibody Array, ab2111069, Abcam, Reino Unido) que mide la expresión de FasL, Fractalquina, G-CSF, IFN-γ, IGF-1, IL-10, IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, KC, LIX, MCP-1, M-CSF, MIP-1α, MMP-2, MMP-3, RAGE, TARC, SDF-1α, TGF-β, TNF-α y VEGF-A (ver listado de abreviaturas). La extracción de proteínas fue similar a la llevada a cabo para la realización del inmunoensayo ELISA con la salvedad de que se utilizó el tampón incluido en el kit comercial y la dilución de las muestras de tejido fue ocho veces superior. Se siguieron las instrucciones del fabricante para realizar la prueba. Las incubaciones se realizaron durante toda la noche y el tiempo de exposición antes del revelado fue de dos minutos. El revelado se realizó gracias a un equipo de quimioluminiscencia MicroChemi 4.2 (DNR Bio Imaging Systems, Israel). El análisis densitométrico de las imágenes se llevó a cabo con el software Image J (Schneider et

al., 2012). La señal obtenida para cada marcador se normalizó con respecto al control positivo como indicador de la concentración de proteína. A continuación, el valor de cada muestra del grupo tratado con VNS se normalizó con respecto al grupo SHAM para representar los datos.

5.12 Estudios histológicos

5.12.1 *Tinción de hematoxilina-eosina*

Las preparaciones histológicas de los nervios extraídos se tiñeron con hematoxilina-eosina para verificar de manera general la ausencia de daño o reacciones inflamatorias como consecuencia del tratamiento. El protocolo seguido se detalla en el **Anexo I**.

5.12.2 *Inmunohistoquímica*

Se estudió la expresión de c-Fos, como marcador de la actividad neuronal, en cuatro regiones de interés para el estudio del mecanismo de acción de la VNS: núcleo del tracto solitario (NTS), locus coeruleus (LC), núcleo dorsal del rafe (DR) y núcleo parabraquial (PBN).

Tras una puesta a punto, en la que se probaron otros protocolos utilizando dos anticuerpos de la casa comercial Abcam (Recombinant Anti-c-Fos Antibody ab222699; Recombinant Anti-c-Fos Antibody ab234964), se decidió optar por un anticuerpo diseñado para rata (c-Fos Antibody 226 008 Synaptic Systems, Alemania). La concentración seleccionada fue de 1:1000, con un tiempo de incubación de 72 horas a 4°C. Las regiones constantes del anticuerpo primario se sustituyeron por secuencias específicas de conejo, por lo que se utilizó un anticuerpo secundario diseñado para esta especie en concentración 1:200 (Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (H+L), Biotinylated BA-1000, Vector Laboratories, Estados Unidos). Para visualizar las secciones, se incubaron en complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (Vectastain ABC kit, Peroxidase PK-4000, Vector Laboratories, Estados Unidos) y se produjo la oxidación de la diaminobencidina (DAB, SK4100, Vector Laboratories, Estados Unidos). Se añadió sulfato de níquel y amonio para aumentar el contraste de la reacción. Los detalles de todos los pasos del protocolo y disoluciones utilizadas se detallan en el **Anexo II**.

Se observaron las secciones en un microscopio Leica LB30T (Alemania) conectado a una cámara Olympus DP70. Se realizó un conteo de las neuronas marcadas y las secciones representativas se fotografiaron con el software DP Controller y DP Manager. Se utilizó como referencia el atlas estereotáxico del cerebro del hámster dorado para identificar las diferentes áreas cerebrales (Morin & Wood, 2001).

5.13 Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó con el software IBM SPSS Statistics, v.26 (SPSS Inc., EE.UU.). La significación estadística se fijó en $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***). Todos los datos se muestran como media $\pm$ desviación estándar.

Dado que el índice de severidad cSI constituye una variable ordinal y los datos de los sujetos sin tratamiento se distribuyen de forma asimétrica alrededor del valor máximo de la escala, se utilizaron test no paramétricos para evaluar el efecto anticonvulsivo de la VNS y los FAE. La severidad de las crisis antes y después del tratamiento dentro del mismo grupo experimental se evaluó mediante pruebas ANOVA no paramétricas para medidas repetidas (Durbin-Conover para comparaciones post-hoc). La comparación entre los grupos SHAM y VNS se llevó a cabo mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Para la elaboración de diagramas de flujo utilizando Ethomatic, se realizó un análisis estadístico χ^2 , cuyos valores logarítmicos son proporcionales al ancho de las flechas mostradas entre cada pareja de comportamientos.

Para el análisis del campo abierto, los datos se representaron como la diferencia de la segunda y tercera prueba, (llevadas a cabo la primera y la segunda semana de tratamiento, respectivamente) con respecto a la primera, realizada sin tratamiento. Las variables que mostraron idoneidad para la aplicación de pruebas paramétricas (ANOVA de una vía con Test de Tukey para comparaciones post-hoc) fueron la distancia recorrida, las elevaciones y el número de entradas a la zona central. Sin embargo, la duración del acicalamiento, el tiempo en la zona central y el tiempo de inmovilidad, no mostraron una distribución normal, ni siquiera en el grupo sin tratamiento ($p < 0,05$, test Shapiro-Wilk), por lo que se aplicó su alternativa no paramétrica (prueba de Friedman con test de Durbin-Conover para comparaciones post-hoc).

Finalmente, la comparación entre los niveles de cada marcador inflamatorio entre los grupos SHAM y VNS se llevó a cabo usando pruebas *t de Student* para datos independientes.

6 Resultados

6.1 Efectos de la VNS sobre las crisis convulsivas

En el registro de las crisis llevado a cabo al inicio del experimento y antes del inicio de ningún tratamiento, los GASH/Sal de todos los grupos experimentales mostraron crisis convulsivas con un índice de severidad cSI elevado. En el grupo SHAM, no se produjeron cambios estadísticamente significativos en la severidad de las crisis. La VNS mostró efecto anticonvulsivo, observándose una importante reducción de la severidad de las crisis. Además, en la comparativa entre los dos neuroestimuladores utilizados, se observó que ambos tuvieron un efecto anticonvulsivo similar, por lo que los sujetos se agruparon conjuntamente en los análisis realizados (**Figura 15**).

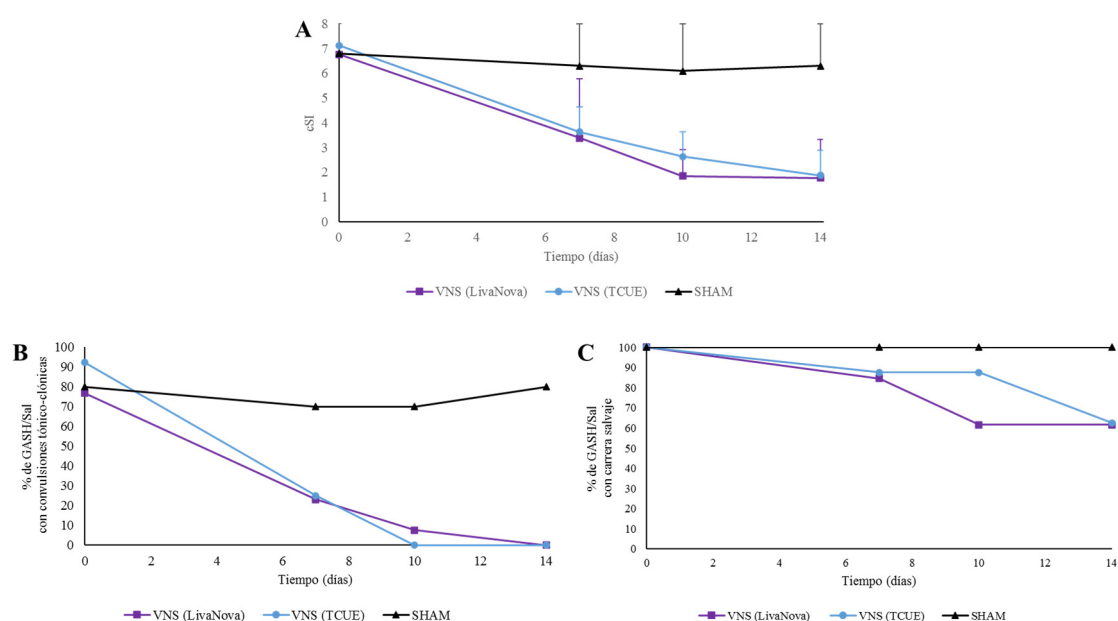


Figura 15. Efecto anticonvulsivo de la VNS. Comparativa entre los dos neuroestimuladores utilizados. A. Severidad de las crisis, según el índice cSI. El grupo designado como TCUE (azul) corresponde a los GASH/Sal tratados con VNS en los que se implantó el neuroestimulador desarrollado por nuestro grupo. Los datos se representan como la media $\pm$ hemidesviación estándar. B. Porcentaje de GASH/Sal que mostraron convulsiones tónico-clónicas. C. Porcentaje de GASH/Sal que mostraron carrera salvaje.

Así, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el índice de severidad cSI entre el grupo SHAM y el tratado con VNS. Destaca que el efecto de la VNS fue progresivo, ya que las diferencias con respecto al registro inicial fueron mayores a los 10 y 14 días tras la cirugía que a los 7 días. Además, se detectaron diferencias significativas entre los registros de los días 10 y 14 en comparación con los resultados obtenidos el día 7 de tratamiento. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados del día 10 y el día 14 (**Figura 16**).

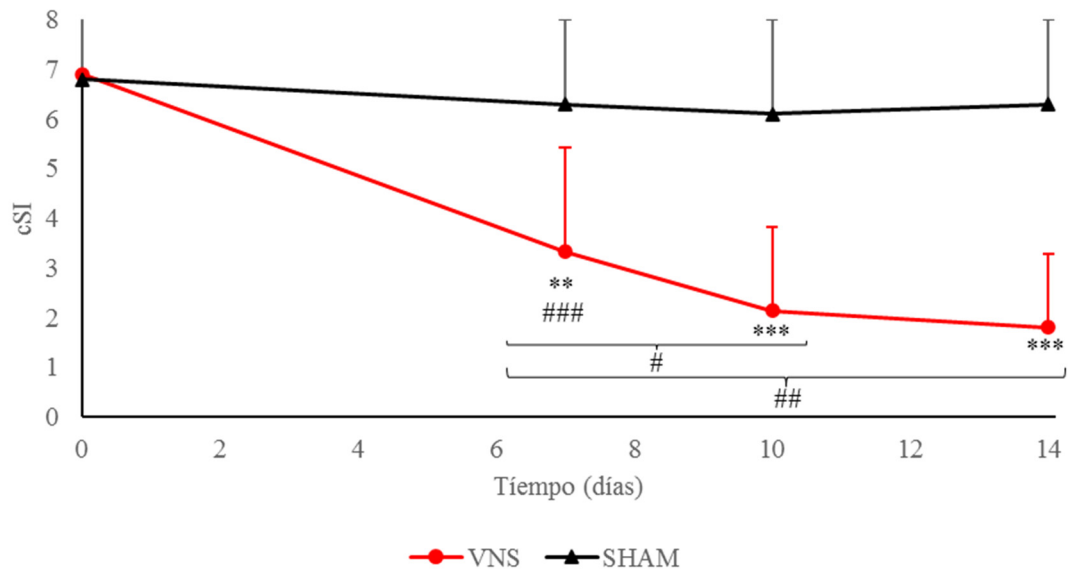


Figura 16. Efecto anticonvulsivo de la VNS. Severidad de las crisis, valorada según el índice cSI. Los datos se representan como la media $\pm$ hemidesviación estándar. El símbolo ‘*’ se utiliza para indicar las diferencias entre los grupos VNS y SHAM. Las diferencias dentro del grupo VNS con respecto a los registros previos se indican con ‘#’. ‘**’ ($p < 0,01$); ‘***’ ($p < 0,001$). ‘#’ ($p < 0,05$); ‘##’ ($p < 0,01$); ‘###’ ($p < 0,001$).

A los 14 días de tratamiento, se produjo la total abolición de las **convulsiones tónico-clónicas** en el grupo tratado con VNS. Durante el experimento, se registró un aumento de la latencia de inicio de la convulsión en aquellos animales que las presentaron (Figura 17).

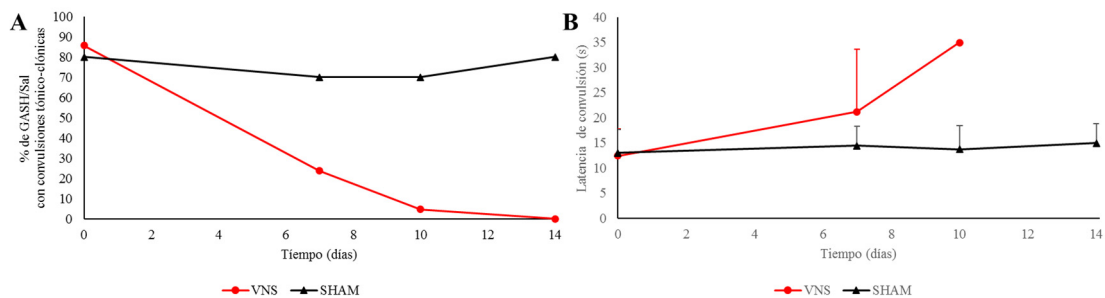


Figura 17. Efecto de la VNS sobre las convulsiones tónico-clónicas. A. Porcentaje de GASH/Sal que mostraron convulsiones tónico-clónicas. B. Latencia de inicio de las convulsiones. Los datos se representan como la media $\pm$ hemidesviación estándar. A los 14 días de tratamiento, ningún GASH tratado con VNS mostró crisis convulsivas.

En un subgrupo de GASH/Sal (38,1%; 8 de 21) se observó la erradicación de cualquier conducta epileptógena, incluida la **carrera salvaje**. En aquellos GASH/Sal que mostraron carrera salvaje, se observó un leve aumento de la latencia, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 18).

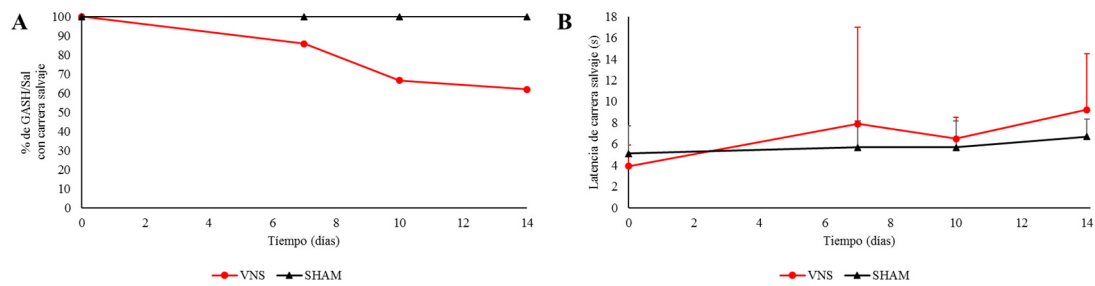


Figura 18. Efecto de la VNS sobre la carrera salvaje. A. GASH/Sal que mostraron carrera salvaje. **B.** Efecto del tratamiento sobre la latencia. Los datos se representan como la media $\pm$ hemidesviación estándar.

6.2 Efectos de la rVNS sobre las crisis convulsivas

La VNS aplicada en el nervio vago derecho (rVNS) mostró un efecto anticonvulsivo similar a la efectuada en el nervio vago izquierdo. En consecuencia, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en el efecto anticonvulsivo de la técnica. Sin embargo, los efectos de la rVNS fueron ligeramente menos potentes, tanto en términos del índice cSI, como teniendo en cuenta su disminución con respecto al registro inicial de las crisis. (**Figura 19**).

Sólo en uno de los casos tratados con rVNS, se registraron crisis convulsivas-tónico clónicas al final del experimento. En este grupo, la latencia de carrera salvaje registrada a los 14 días fue menor que la registrada el día 10. El resto de los parámetros analizados siguieron la misma tendencia en los grupos rVNS y VNS (**Figura 20**).

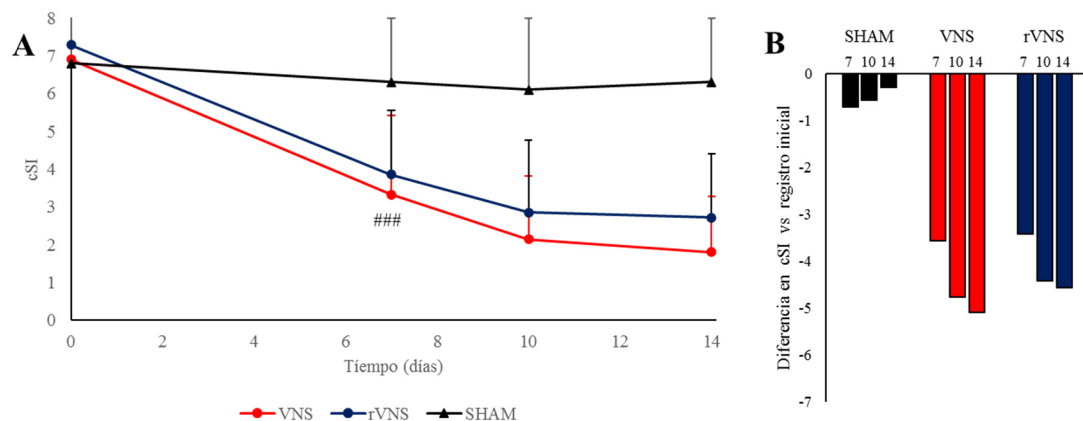


Figura 19. Comparativa del efecto anticonvulsivo de la VNS y la rVNS. A. Severidad de las crisis según el índice cSI. Los '#' representan las diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo tratado con rVNS, con respecto al registro inicial. '###' ($p < 0.001$). **B.** Diferencias en el índice cSI con respecto al registro inicial.

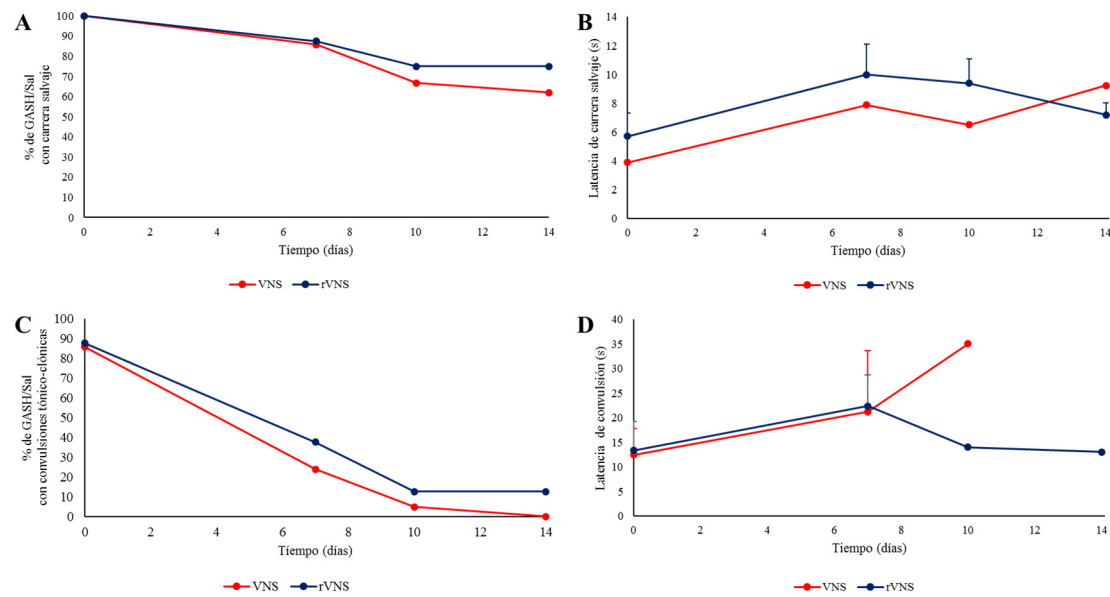


Figura 20. Comparativa de los efectos de la VNS y la rVNS sobre la carrera salvaje y las convulsiones tónico-clónicas. A. Porcentaje de GASH/Sal que mostraron carrera salvaje. B. Latencia de inicio de la carrera salvaje. C. Porcentaje de GASH/Sal que mostraron convulsiones tónico-clónicas. D. Latencia de inicio de las convulsiones tónico-clónicas. Los datos se representan como la media $\pm$ hemidesviación estándar.

6.3 Niveles de fármacos en sangre

Los picos de máxima concentración en sangre se situaron a los 10 minutos para el fenobarbital (13,2 ppm), 5 minutos para el ácido valproico (233,9 ppm), y 15 minutos para la lamotrigina (5,5 ppm) y el levetiracetam (99,6 ppm).

Los resultados de los análisis muestran cómo los niveles de fenobarbital y levetiracetam en sangre fueron claramente menores en los animales tratados simultáneamente con VNS. En el caso de la lamotrigina, también se observa esta tendencia, aunque la diferencia es más sutil. En el caso del ácido valproico, sólo se obtuvieron niveles menores del principio activo en sangre en el grupo tratado con VNS en la primera extracción a los 5 minutos tras el pinchazo (**Figura 21**).

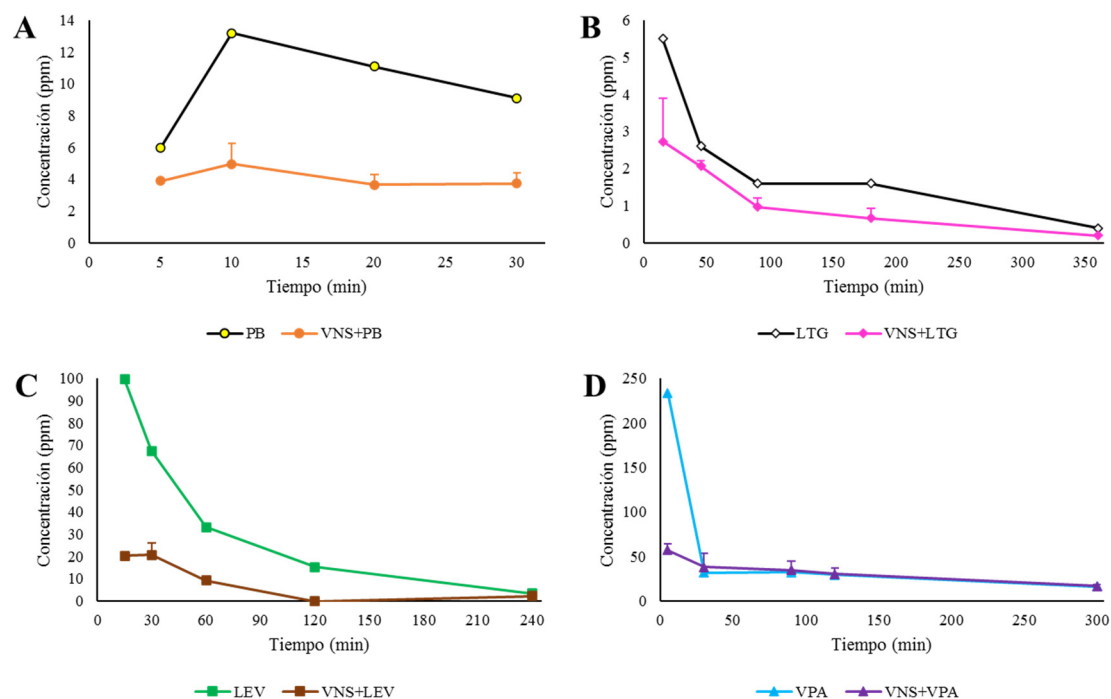


Figura 21. Curva de niveles de los fármacos en sangre administrados de forma aislada y en combinación con VNS: fenobarbital (A), lamotrigina (B), levetiracetam (C), ácido valproico (D). La concentración se expresa en partes por millón.

6.4 Efectos de los FAE sobre las crisis convulsivas

6.4.1 Fenobarbital

La administración de 10 mg/kg de fenobarbital (PB), produjo un efecto anticonvulsivo estadísticamente significativo. El mayor impacto del fármaco sobre las crisis se produjo a los 7 días de tratamiento, con un repunte en el valor del índice cSI en los registros realizados el día 10 y 14 del experimento.

El PB, a la dosis seleccionada, mostró un efecto anticonvulsivo mayor que la VNS a los 7 días, pero menor que ésta los días 10 y 14 de tratamiento.

En el grupo tratado con VNS+PB se apreció un efecto anticonvulsivo similar al grupo tratado solo con VNS. Los días 10 y 14 se mantuvo el efecto de la VNS, superior al del PB, sin mostrar un efecto sumatorio. El grupo tratado con VNS+PB destacó porque, además de la inhibición total de las convulsiones en todos los registros, la latencia de carrera salvaje fue levemente mayor que en el grupo tratado solo con VNS (**Figura 22**).

6.4.2 Lamotrigina

La lamotrigina (LTG), a pesar de haber mostrado efecto anticonvulsivo en el GASH/Sal, no ha supuesto efectos beneficiosos adicionales a los de la VNS cuando se ha administrado en combinación con esta terapia. Además, no ha tenido impacto sobre la latencia de inicio de la carrera salvaje, y la respuesta a nivel global podría considerarse ligeramente inferior que el grupo tratado sólo con VNS, puesto que uno de

los animales tratados con VNS+LTG mostró convulsiones tónico-clónicas en el último de los registros realizados (**Figura 23**).

6.4.3 *Levetiracetam*

La inyección de levetiracetam (LEV) produjo un efecto anticonvulsivo similar al de la VNS el día 7 de tratamiento, e inferior a ella los días 10 y 14. Los índices de severidad obtenidos en el grupo tratado con VNS+Lev fueron incluso peores que los del grupo tratado sólo con VNS. Aunque en el grupo con doble tratamiento se observó un ligero aumento de la latencia de inicio de carrera salvaje y las convulsiones, y estas últimas se eliminaron completamente antes que en el grupo tratado sólo con VNS, el porcentaje total de GASH/Sal que respondieron de forma completa al tratamiento fue menor, si consideramos la abolición de la carrera salvaje (**Figura 24**).

6.4.4 *Ácido valproico*

El tratamiento con ácido valproico (VPA) se tradujo en un efecto anticonvulsivo que fue mayor en el registro realizado el día 10, momento en el que se observó la abolición total de las crisis en uno de los sujetos experimentales y la ausencia de crisis convulsivas tónico-clónicas en el resto de GASH/Sal.

El tratamiento combinado de VNS+VPA produjo un efecto anticonvulsivo similar al que produce la VNS en solitario, pero en este caso sí se observó un efecto mayor que la VNS si tenemos en cuenta el índice de severidad de partida. Por otro lado, en el grupo con tratamiento combinado con VNS+VPA, se observó una abolición total de las convulsiones tónico-clónicas en todos los registros. No se observó ningún efecto sobre la latencia de carrera salvaje ni sobre el porcentaje de animales que mostraron eliminación de esta conducta (**Figura 25**).

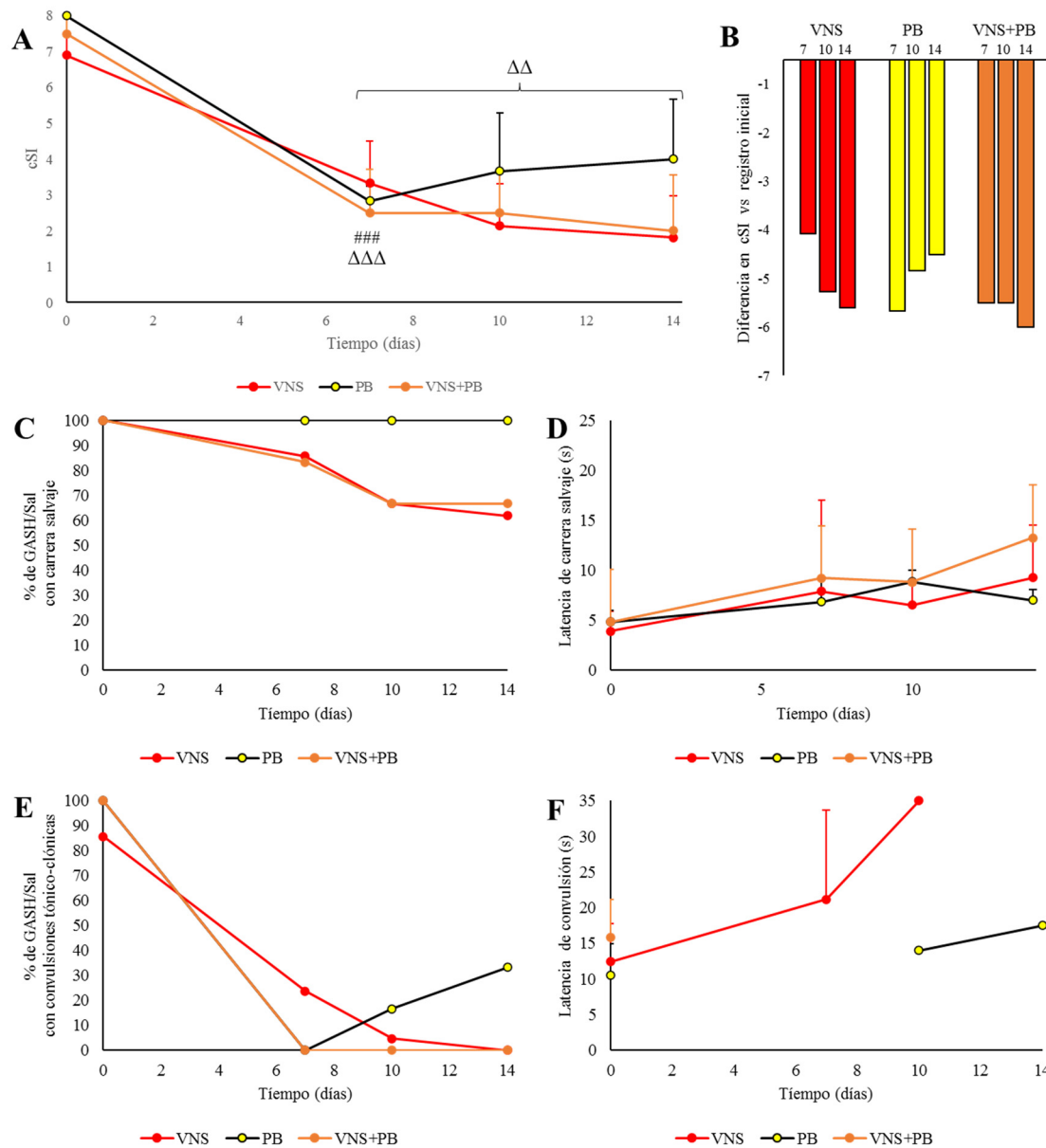


Figura 22. Comparativa del efecto anticonvulsivo del PB, la VNS y el tratamiento combinado con VNS+PB **A.** Severidad de las crisis según el índice cSI. Los símbolos ‘Δ’ y ‘#’ representan las diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo tratado con PB y VNS+PB, respectivamente, con respecto al registro inicial. ‘ΔΔ’ ($p < 0,01$); ‘ΔΔΔ’ ($p < 0,001$); ‘###’ ($p < 0,001$). **B.** Diferencias en el índice cSI con respecto al registro inicial. **C.** Porcentaje de GASH/Sal que mostraron carrera salvaje. **D.** Latencia de inicio de la carrera salvaje. **E.** Porcentaje de GASH/Sal que mostraron convulsiones tónico-clónicas. **F.** Latencia de inicio de las convulsiones tónico-clónicas. Los datos se representan como la media $\pm$ hemidesviación estándar.

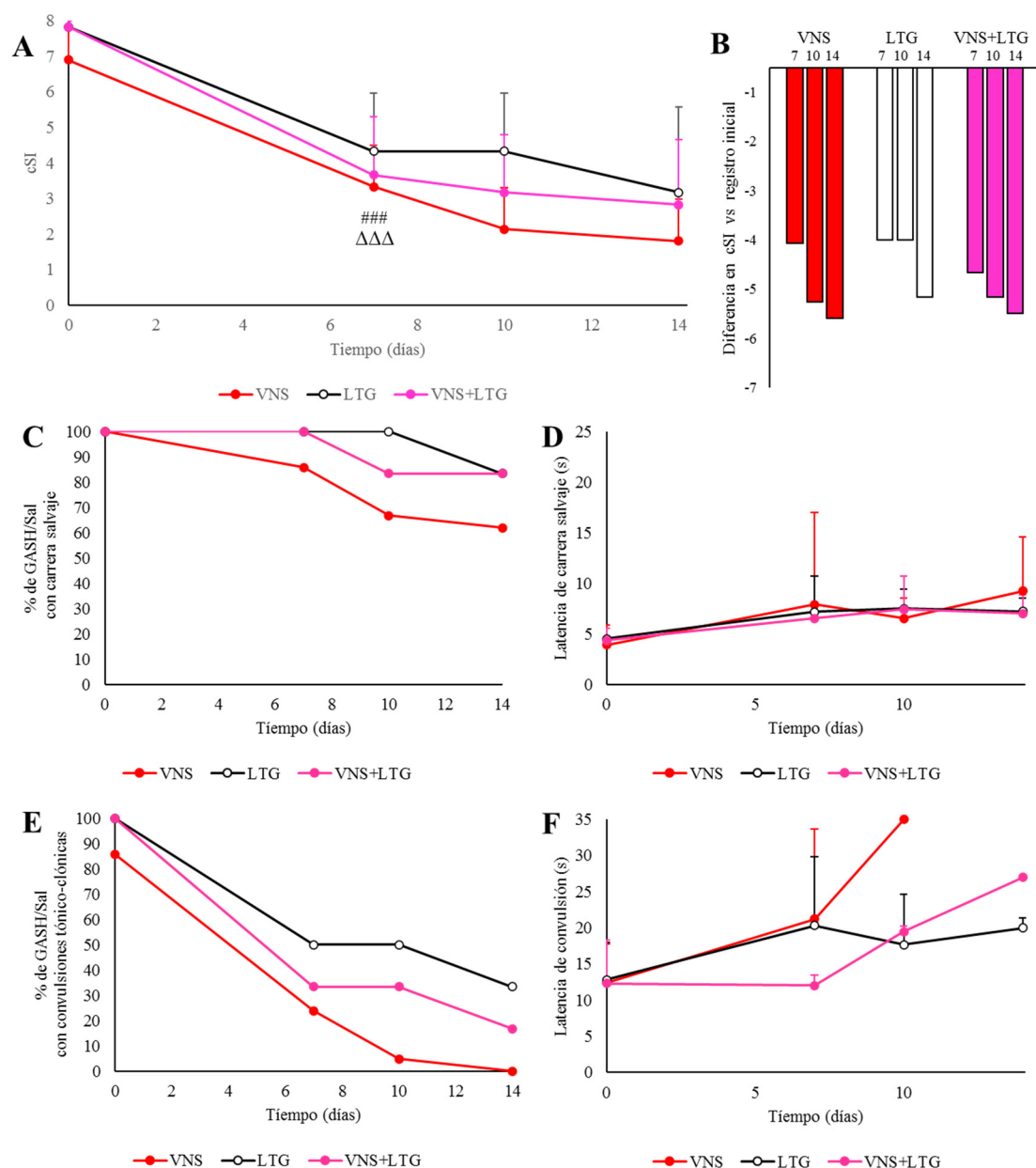


Figura 23. Comparativa del efecto anticonvulsivo de la LTG, la VNS y el tratamiento combinado con VNS+LTG **A.** Severidad de las crisis según el índice cSI. Los símbolos ‘Δ’ y ‘#’ representan las diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo tratado con LTG y VNS+LTG, respectivamente, con respecto al registro inicial. ‘ΔΔΔ’ ($p < 0,001$); ‘###’ ($p < 0,001$). **B.** Diferencias en el índice cSI con respecto al registro inicial. **C.** Porcentaje de GASH/Sal que mostraron carrera salvaje. **D.** Latencia de inicio de la carrera salvaje. **E.** Porcentaje de GASH/Sal que mostraron convulsiones tónico-clónicas. **F.** Latencia de inicio de las convulsiones tónico-clónicas. Los datos se representan como la media $\pm$ hemidesviación estándar.

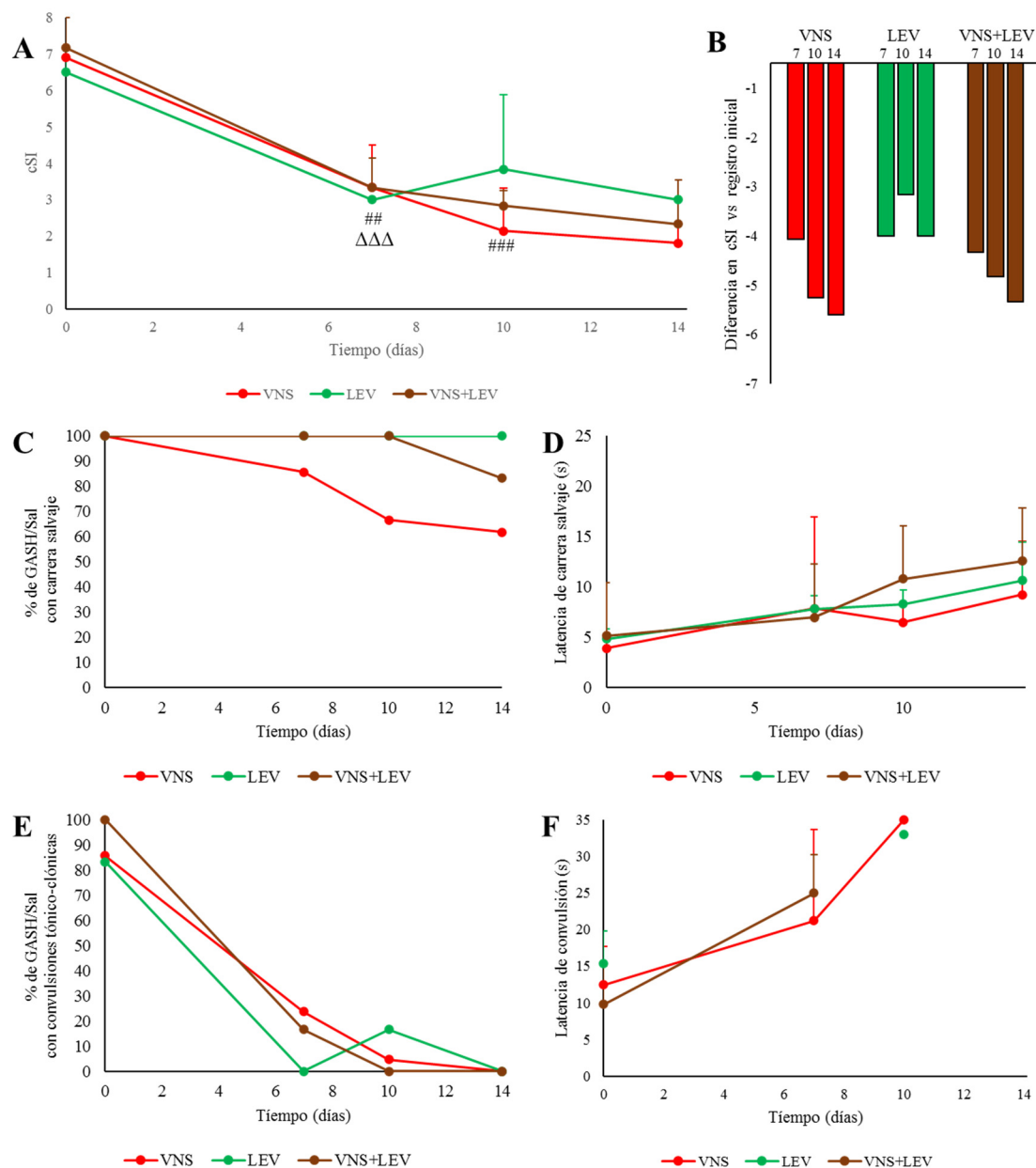


Figura 24. Comparativa del efecto anticonvulsivo del LEV, la VNS y el tratamiento combinado con VNS+LEV. A. Severidad de las crisis según el índice cSI. Los ‘Δ’ y los ‘#’ representan las diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo tratado con LEV y VNS+LEV, respectivamente, con respecto al registro inicial. ‘ΔΔΔ’ ($p < 0,001$); ‘##’ ($p < 0,01$); ‘###’ ($p < 0,001$). B. Diferencias en el índice cSI con respecto al registro inicial. C. Porcentaje de GASH/Sal que mostraron carrera salvaje. D. Latencia de inicio de la carrera salvaje. E. Porcentaje de GASH/Sal que mostraron convulsiones tónico-clónicas. F. Latencia de inicio de las convulsiones tónico-clónicas. Los datos se representan como la media $\pm$ hemidesviación estándar.

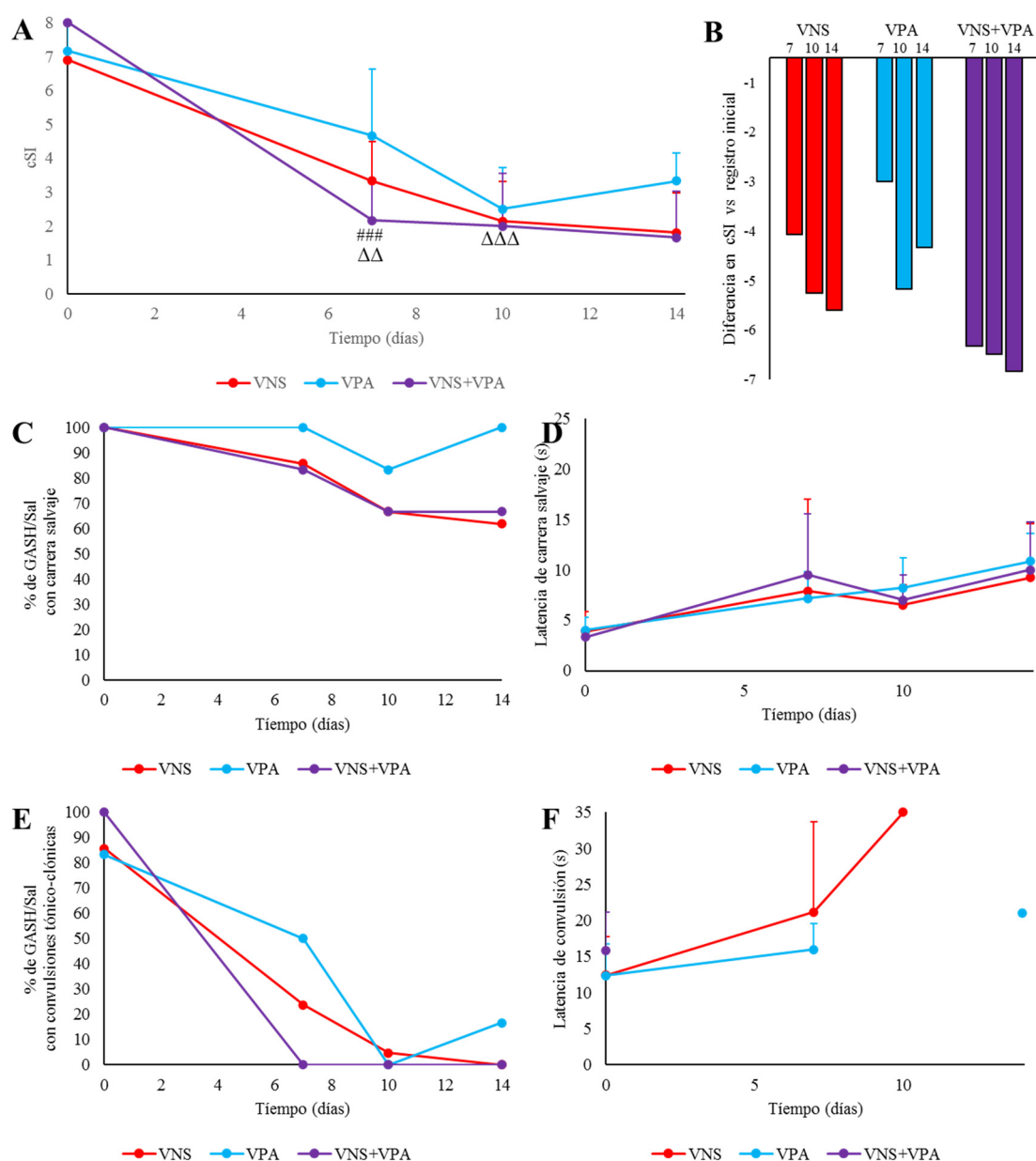


Figura 25. Comparativa del efecto anticonvulsivo del VPA, la VNS y el tratamiento combinado con VNS+VPA. A. Severidad de las crisis según el índice cSI. Los ‘Δ’ y los ‘#’ y los representan las diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo tratado con VPA y VNS+VPA, respectivamente, con respecto al registro inicial. ‘###’ ($p < 0,001$); ‘ΔΔ’ ($p < 0,01$); ‘ΔΔΔ’ ($p < 0,001$). B. Diferencias en el índice cSI con respecto al registro inicial. C. Porcentaje de GASH/Sal que mostraron carrera salvaje. D. Latencia de inicio de la carrera salvaje. E. Porcentaje de GASH/Sal que mostraron convulsiones tónico-clónicas. F. Latencia de inicio de las convulsiones tónico-clónicas. Los datos se representan como la media $\pm$ hemidesviación estándar.

6.5 Estudio neuroetológico

En las siguientes páginas, se muestran los resultados del estudio neuroetológico. Los registros previos a cualquier tratamiento muestran las características típicas de las crisis mostradas por el hámster GASH/Sal. Habitualmente, tras la exposición al sonido se produce un sobresalto, que puede estar acompañado de un breve periodo de inmovilidad o alerta, tras el cual se desencadena la fase de carrera salvaje (comportamientos en amarillo). Esta carrera se produce en ambas direcciones y se asocia con saltos y caídas. Posteriormente, suelen producirse comportamientos convulsivos (en rojo). En los animales que muestran crisis de severidad máxima, se producen convulsiones tónicas seguidas de la flexión ventral de la cabeza e hiperextensión de las patas anteriores y posteriores. A continuación, pueden producirse convulsiones clónicas. Por último, los animales presentan un periodo de estupor postictal, en el que se pueden observar alteraciones de la respiración y automatismos orofaciales.

6.5.1 Etogramas grupo SHAM

En los etogramas correspondientes al registro final del grupo SHAM, no se observaron diferencias notables con respecto al registro inicial, manteniéndose las características típicas de las crisis del GASH/Sal, con todas las fases descritas anteriormente (**Figura 26**).

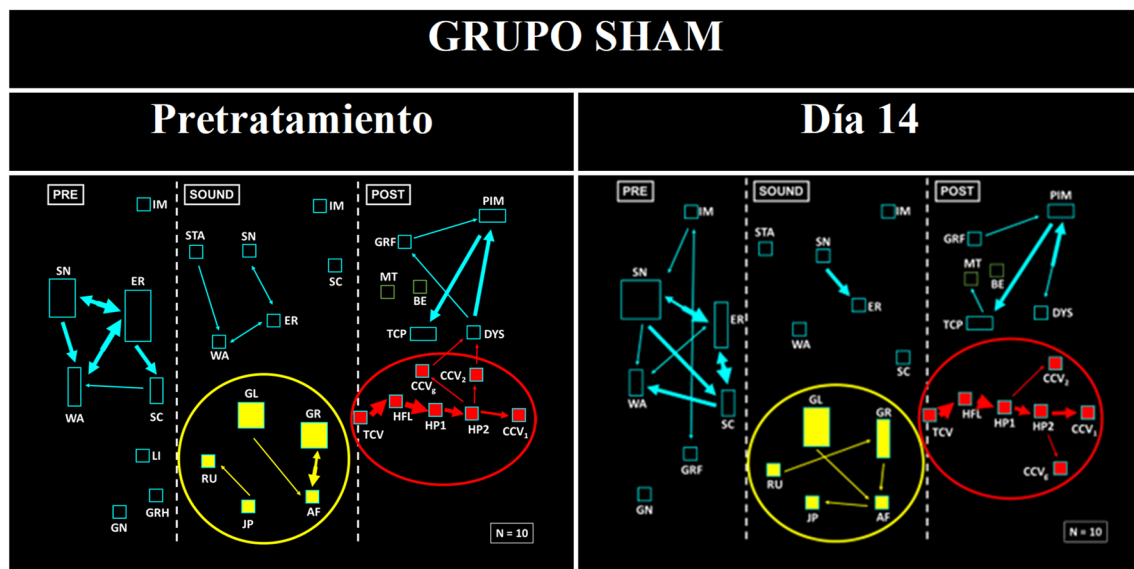


Figura 26. Etogramas correspondientes al grupo SHAM. Diagramas de flujo que muestran las secuencias de comportamiento características de las crisis de los GASH/Sal pertenecientes al grupo SHAM en estado basal (Pretratamiento: izquierda) y al finalizar el experimento (Día 14: derecha). Ver abreviaturas en el diccionario de comportamientos (**Tabla 3**).

6.5.2 Etogramas grupo VNS

Para el análisis neuroetológico del resto de grupos, con tratamiento anticonvulsivo de fármacos y VNS, se realizó una agrupación de los animales en función del cSI de las crisis tras el tratamiento, como los que no presentaron crisis ($cSI = 0$) y los que mostraron carrera salvaje ($cSI > 0$).

En el grupo tratado con VNS, en el subgrupo de GASH/Sal con $cSI > 0$, se observó una reducción de la fase convulsiva y un aumento de la carrera salvaje. Este aumento se relaciona con el mayor tiempo de exposición de estos animales al sonido, dado que una vez que se desencadena la carrera salvaje, si el sujeto no entra en fase convulsiva, la carrera salvaje se mantiene hasta que, o bien el sonido cesa, o el animal se detiene y entra en fase de estupor. A los 10 días de tratamiento, se observó una reducción muy marcada de los comportamientos convulsivos, que únicamente se produjeron en un animal. El día 14 de tratamiento, no se observaron convulsiones tónico-clónicas en ningún animal tratado con VNS.

En el subgrupo de GASH/Sal sometidos a VNS con $cSI = 0$, destaca que, a pesar de observarse sobresalto tras la exposición al sonido, esto no desencadenó carrera salvaje ni ninguna conducta convulsiva observable (**Figura 27**).

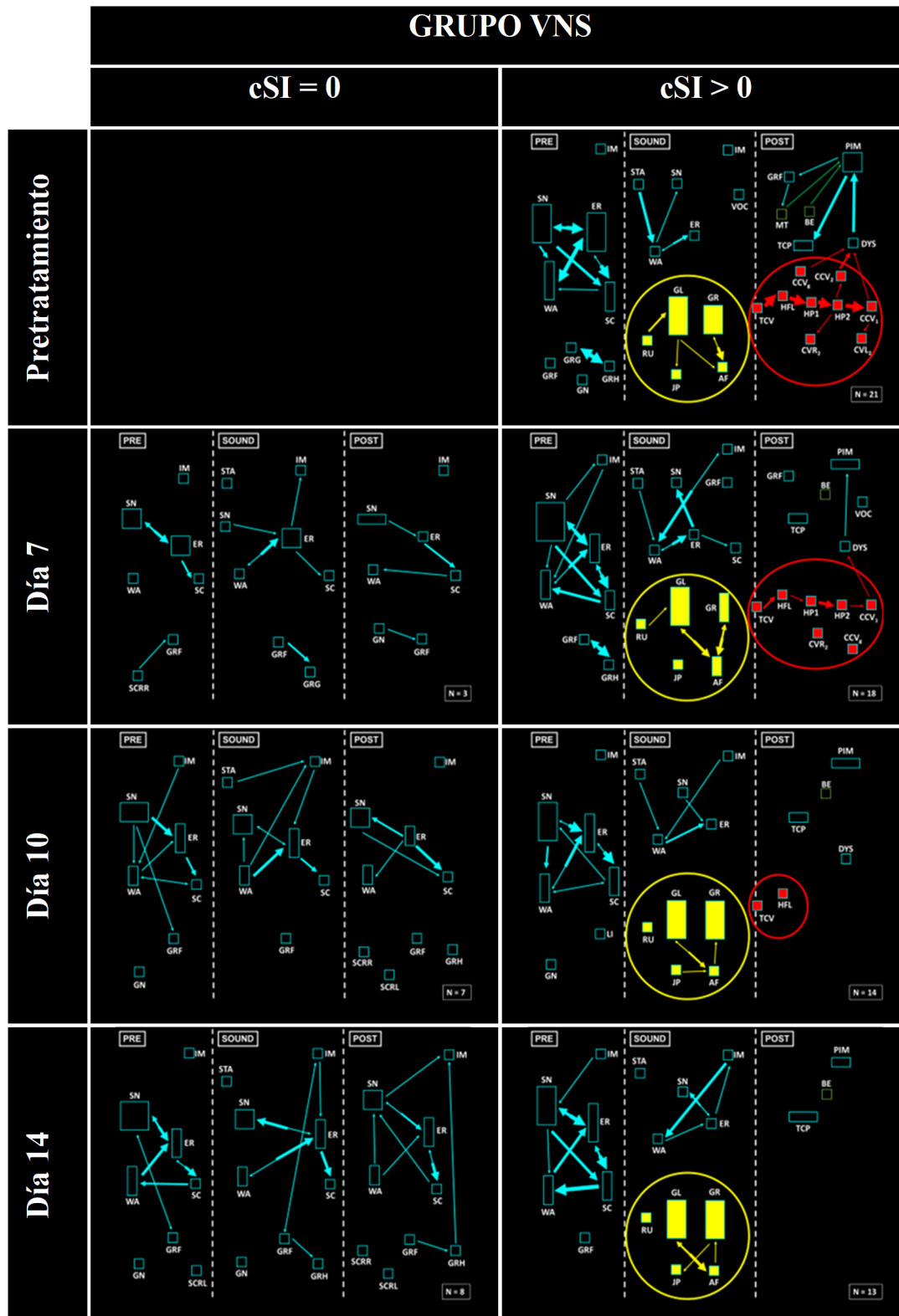


Figura 27. Etogramas correspondientes al grupo VNS. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de las crisis en los GASH/Sal tratados con VNS, en estado basal (Pretratamiento) y a los días 7, 10 y 14 de tratamiento. Ver abreviaturas en el diccionario de comportamientos.

6.5.3 *Etogramas grupo rVNS*

El efecto anticonvulsivo de la estimulación del nervio vago derecho (rVNS) fue similar al de la VNS izquierda, con la diferencia de que existió un caso en el que se mantuvieron crisis de severidad máxima a los 14 días de tratamiento. Al tratarse de comportamientos aislados y no la tendencia general del grupo, no se apreciaron asociaciones significativas entre los comportamientos convulsivos en los registros correspondientes al tratamiento. (**Figura 28**).

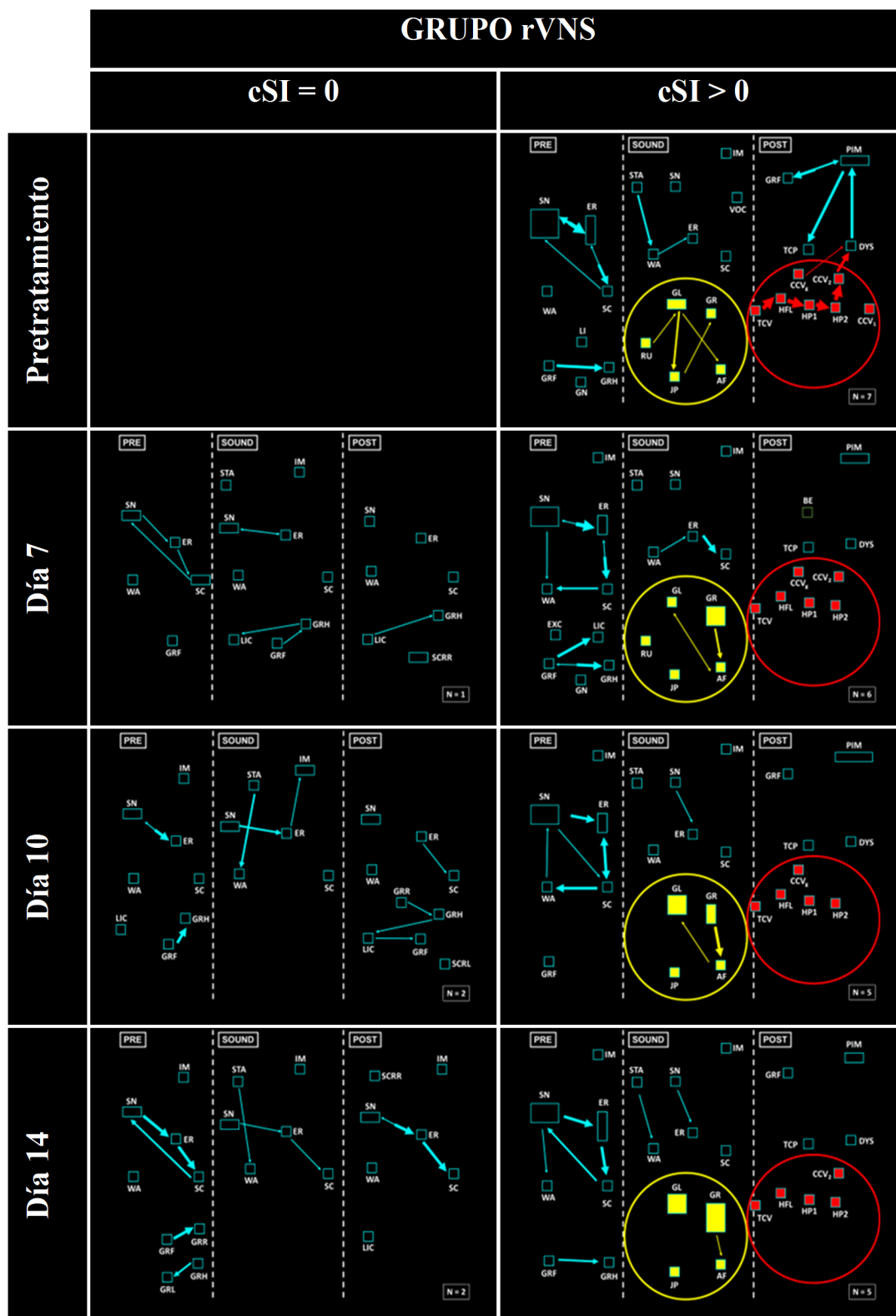


Figura 28. Etogramas correspondientes al grupo rVNS. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de las crisis en los GASH/Sal tratados con rVNS, en estado basal (Pretratamiento) y a los días 7, 10 y 14 de tratamiento. Ver abreviaturas en el diccionario de comportamientos.

6.5.4 Etogramas grupos PB

Los diagramas de flujo del grupo tratado con PB son representativos de crisis de baja severidad, pero que mantienen las fases de carrera salvaje y estupor. El tratamiento durante 7 días con PB provocó la ausencia de convulsiones. Sin embargo, a los 10 y 14 días de tratamiento se produjo un repunte parcial de los comportamientos convulsivos (Figura 29).

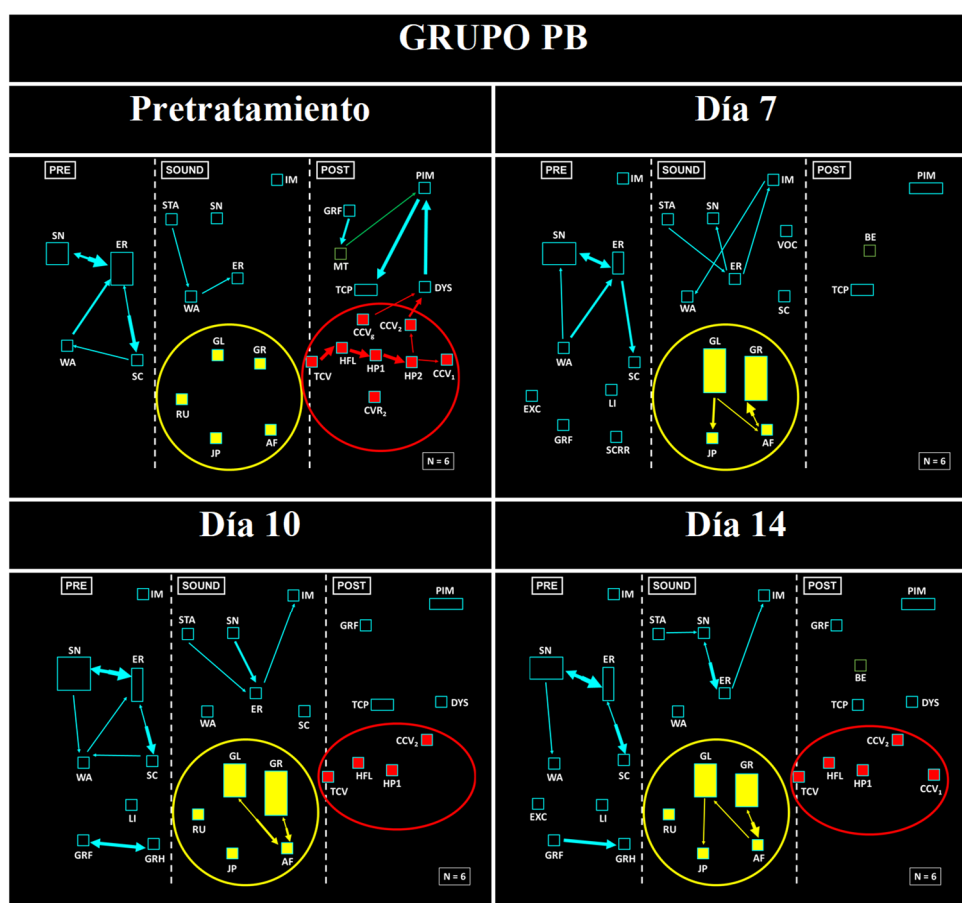


Figura 29. Etogramas correspondientes al grupo PB. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de las crisis en los GASH/Sal tratados con 10 mg/kg de PB, en estado basal (Pretratamiento) y a los días 7, 10 y 14 de tratamiento. Ver abreviaturas en el diccionario de comportamientos.

El tratamiento combinado de VNS y PB se caracterizó por la ausencia de comportamientos convulsivos. Un tercio de los sujetos mostró una respuesta máxima al tratamiento, con ausencia de cualquier conducta aberrante (Figura 30).

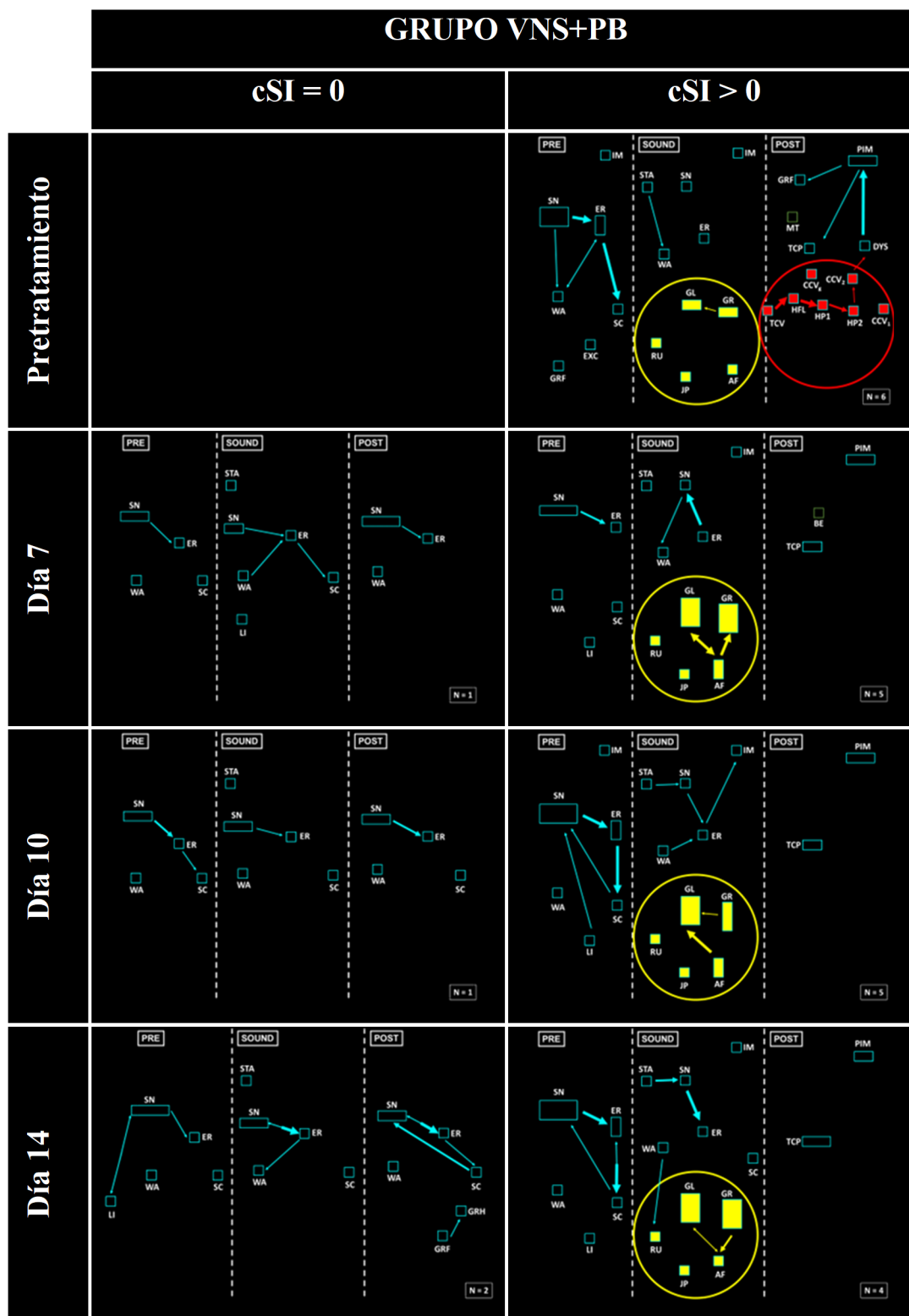


Figura 30. Etogramas correspondientes al grupo VNS+PB. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de las crisis en los GASH/Sal tratados con 10 mg/kg de PB y VNS, en estado basal (Pretratamiento) y a los días 7, 10 y 14 de tratamiento. Ver abreviaturas en el diccionario de comportamientos.

6.5.5 *Etogramas grupos LTG*

En el caso de la LTG, los etogramas reflejaron una mezcla de crisis de baja severidad ($cSI = 3$), con convulsiones tónico-clónicas ($cSI = 5-7$). En el día 14, destacó la obtención de un $cSI = 0$ en uno de los animales (**Figura 31**).

En el caso del tratamiento combinado con VNS+LTG, se observó sólo un sujeto en el que se produjeron convulsiones tónico-clónicas al finalizar el experimento ($cSI = 5$). Ningún animal mostró abolición total de la carrera salvaje el día 7 de tratamiento. Lo más llamativo es la permanencia de convulsiones tónico-clónicas sin hiperextensión de las extremidades los días 10 y 14 (**Figura 32**).

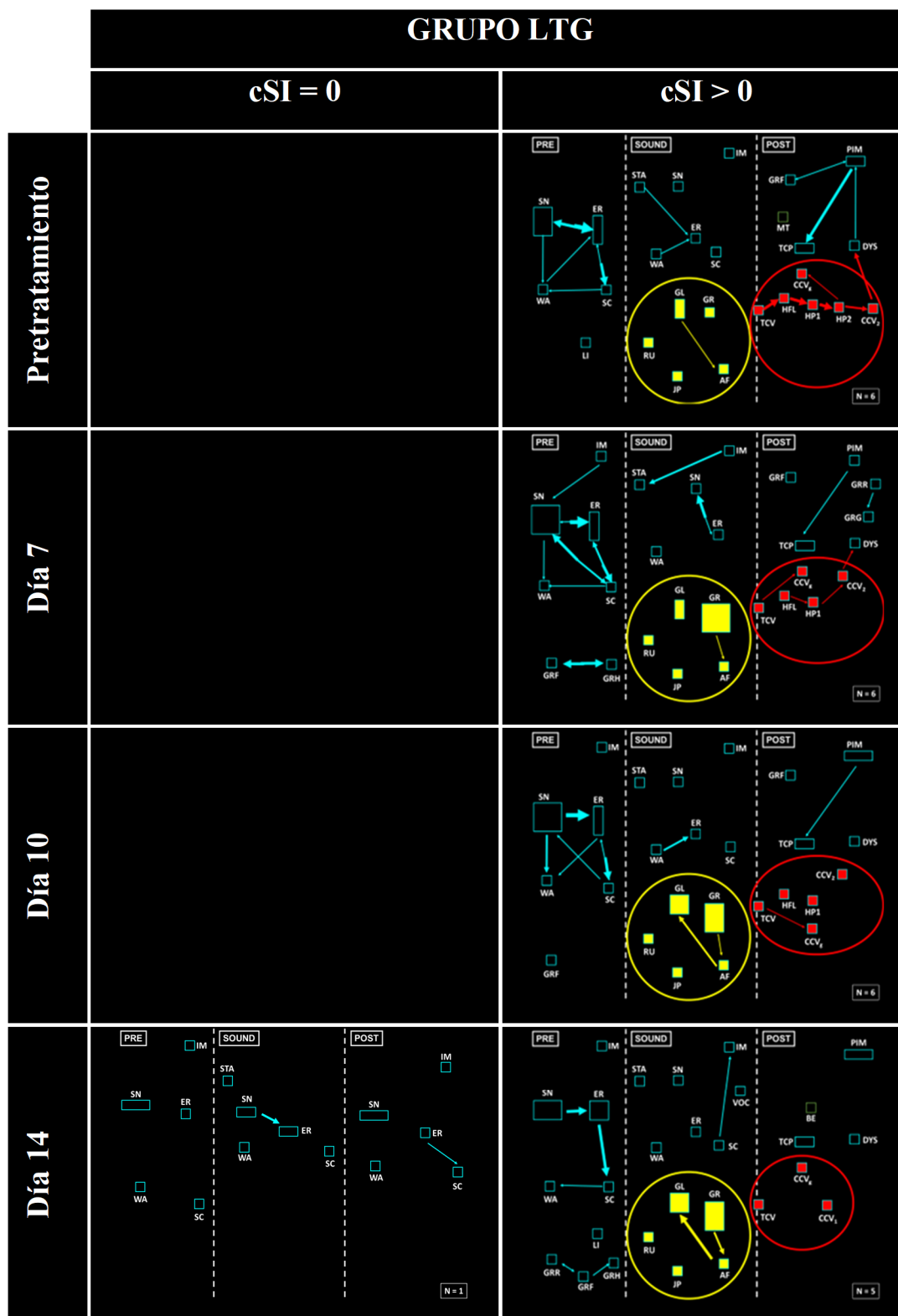


Figura 31. Etogramas correspondientes al grupo LTG. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de las crisis en los GASH/Sal tratados con 5 mg/kg de LTG, en estado basal (Pretratamiento) y a los días 7, 10 y 14 de tratamiento. Ver abreviaturas en el diccionario de comportamientos.

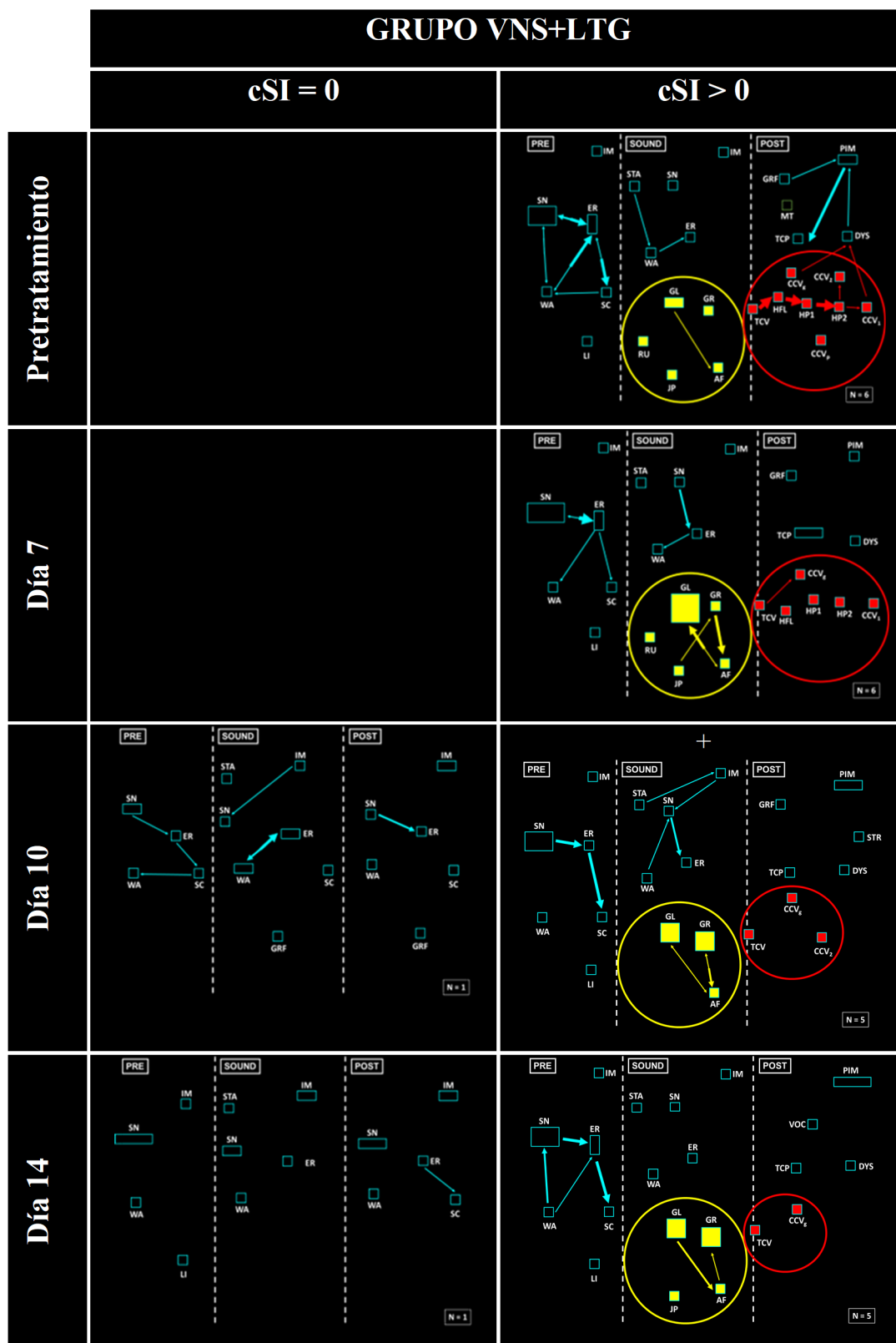


Figura 32. Etogramas correspondientes al grupo VNS+LTG. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de las crisis en los GASH/Sal tratados con 5 mg/kg de LTG y VNS, en estado basal (Pretratamiento) y a los días 7, 10 y 14 de tratamiento. Ver abreviaturas en el diccionario de comportamientos.

6.5.6 Etogramas grupos LEV

El grupo tratado con LEV mostró análisis neuroetológicos muy similares en todos los registros, salvo el correspondiente al día 10, con la presencia de un caso que mostró crisis convulsivas completas, a diferencia del resto de animales que mostraron solo carrera salvaje y estupor. En consecuencia, se observó un alargamiento de la fase de carrera salvaje. En el día 14 se observaron mayor número de comportamientos de acicalamiento en la ventana presonido (Figura 33).

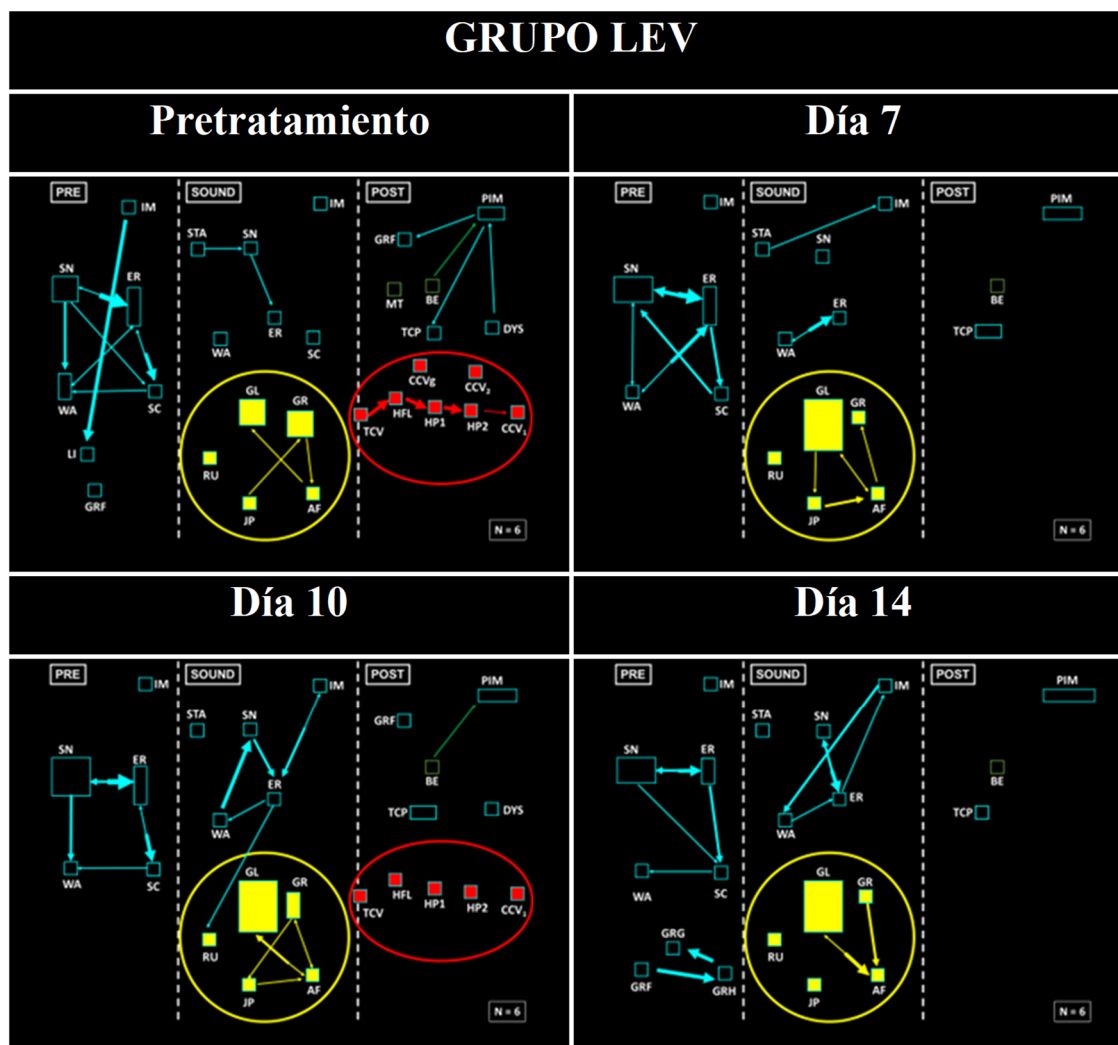


Figura 33. Etogramas correspondientes al grupo LEV. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de las crisis en los GASH/Sal tratados con 100 mg/kg de LEV, en estado basal (Pretratamiento) y a los días 7, 10 y 14 de tratamiento. Ver abreviaturas en el diccionario de comportamientos.

En el grupo VNS+LEV se produjo la abolición total de las convulsiones los días 10 y 14, y una reducción muy notable el día 7. Sin embargo, los días 7 y 10 no se observó ningún sujeto con respuesta total al tratamiento, a diferencia de lo sucedido en el grupo tratado sólo con VNS.

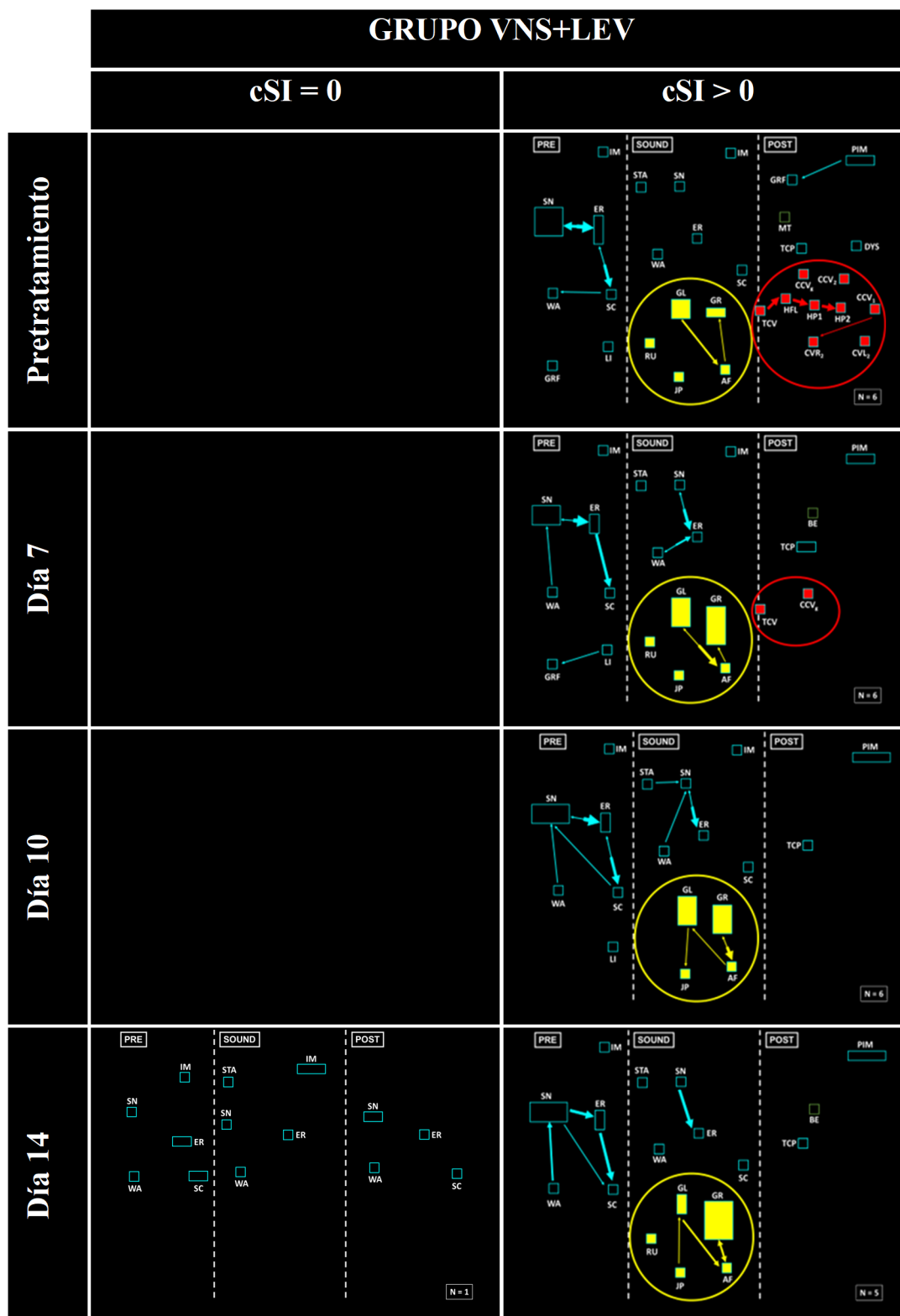


Figura 34. Etogramas correspondientes al grupo VNS+LEV. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de las crisis en los GASH/Sal tratados con 100 mg/kg de LEV y VNS, en estado basal (Pretratamiento) y a los días 7, 10 y 14 de tratamiento. Ver abreviaturas en el diccionario de comportamientos.

6.5.7 Etogramas grupos VPA

Por último, en el grupo tratado con VPA, los diagramas reflejaron una combinación de crisis de severidad variable, que incluyen carrera salvaje, seguida o no de convulsiones tónico-clónicas, o incluso ausencia de crisis. Destaca en los análisis del día 10 la eliminación completa de las crisis en un animal, y la ausencia de convulsiones en el resto de los animales en dicho registro (**Figura 35**). Los etogramas del grupo VNS+VPA son muy parecidos a los del grupo VNS, con la diferencia de que la abolición de las convulsiones tónico-clónicas es total desde el día 7 (**Figura 36**).

Si analizamos el efecto de todos los FAE sobre las crisis en conjunto, observamos que la combinación con VNS produjo una disminución de los comportamientos asociados con las convulsiones tónico-clónicas, especialmente en el registro del día 7 de tratamiento, pero no se relacionó con un aumento del número de los animales con cSI = 0 e inhibición completa de las crisis en cualquiera de los registros.

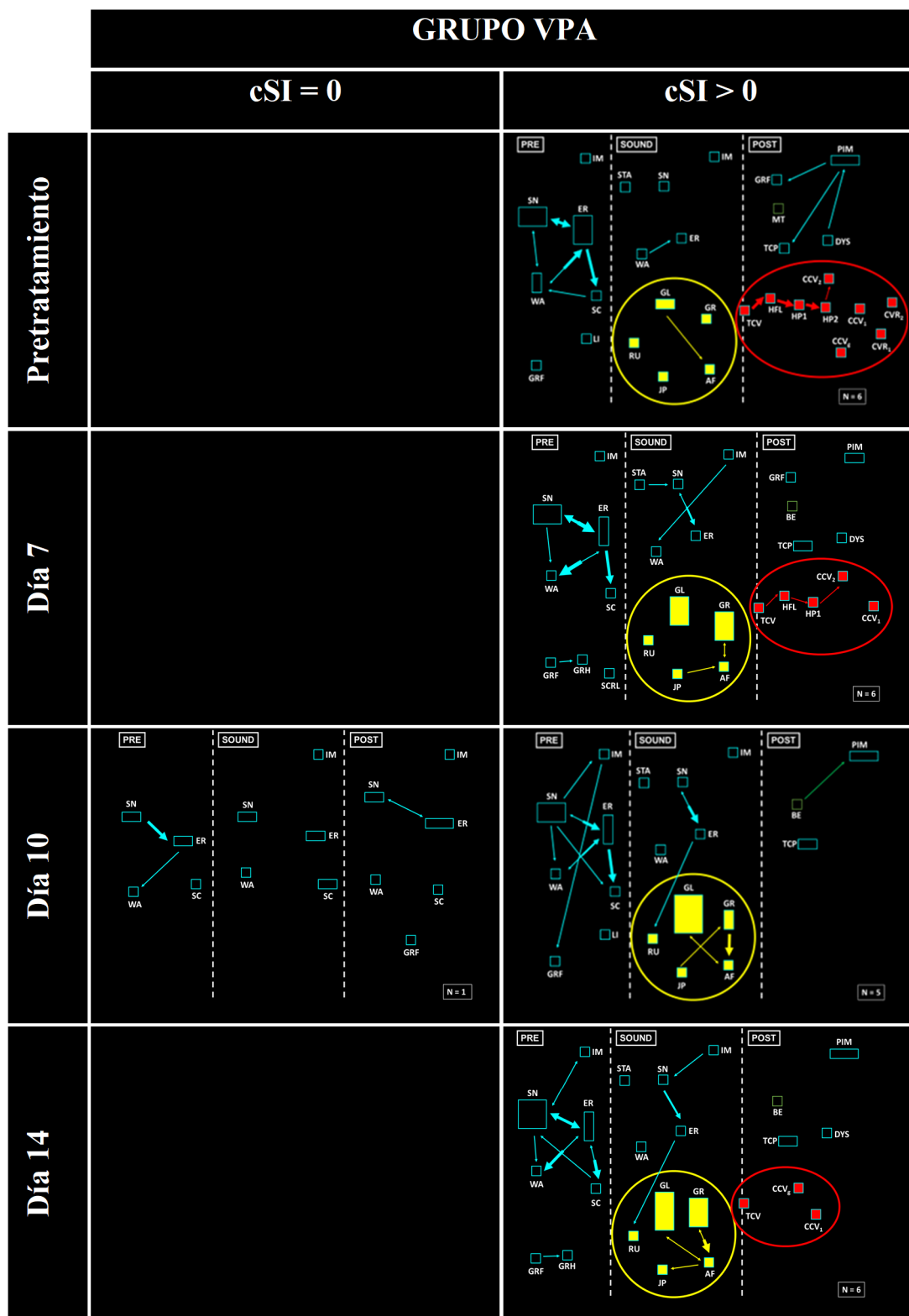


Figura 35. Etogramas correspondientes al grupo VPA. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de las crisis en los GASH/Sal tratados con 300 mg/kg de VPA, en estado basal (Pretratamiento) y a los días 7, 10 y 14 de tratamiento. Ver abreviaturas en el diccionario de comportamientos.

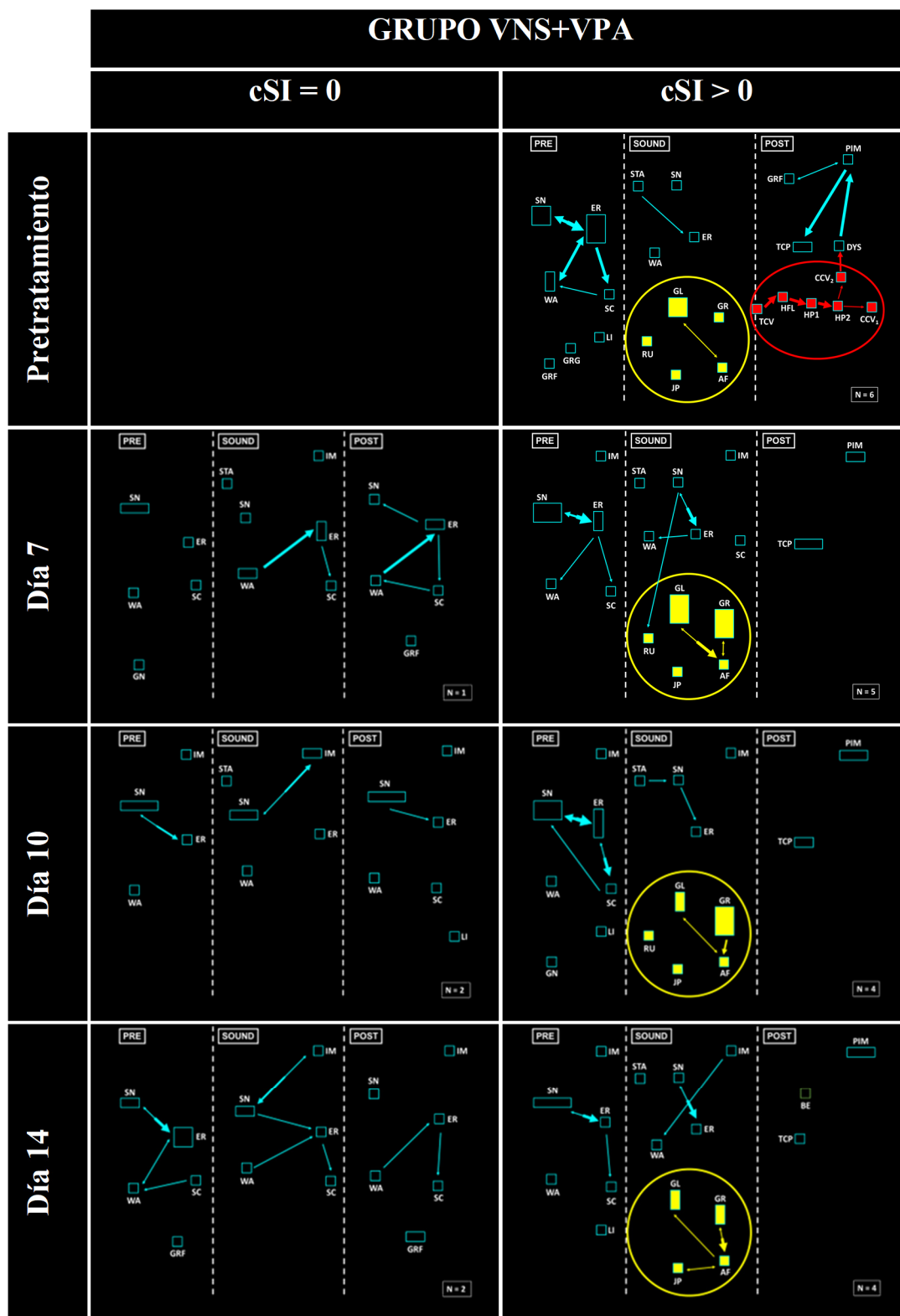


Figura 36. Etoграмas correspondientes al grupo VNS+VPA. Diagramas de flujo de las secuencias de comportamiento de las crisis en los GASH/Sal tratados con 300 mg/kg de VPA y VNS, en estado basal (Pretratamiento) y a los días 7, 10 y 14 de tratamiento. Ver abreviaturas en el diccionario de comportamientos.

6.6 Efectos sobre el comportamiento de VNS y FAE: prueba de campo abierto

Se observó una tendencia de reducción de la **distancia recorrida** a nivel general en los sucesivos registros de actividad realizados. Los valores medios en este parámetro de todos los grupos fueron negativos con respecto al grupo inicial, salvo en el grupo tratado con la combinación de VNS y fenobarbital. Se detectaron reducciones estadísticamente significativas en la distancia recorrida en los animales tratados con VNS a los 7 y 14 días con respecto a la prueba inicial, aunque hay que tener en cuenta que el tamaño muestral del grupo con VNS es mayor que el resto. Se detectaron diferencias en la segunda semana en los GASH tratados con levetiracetam, ácido valproico, y VNS+VPA. No se detectaron diferencias al comparar los diferentes grupos entre sí. No obstante, aparentemente esta disminución de la distancia recorrida fue menor en los sujetos tratados con VNS+FAE que en los que recibieron un único tratamiento. Al analizar todos los FAE en conjunto, los animales mostraron una disminución de la distancia recorrida que no se detecta en el grupo tratado con VNS+FAE. (Figura 37).

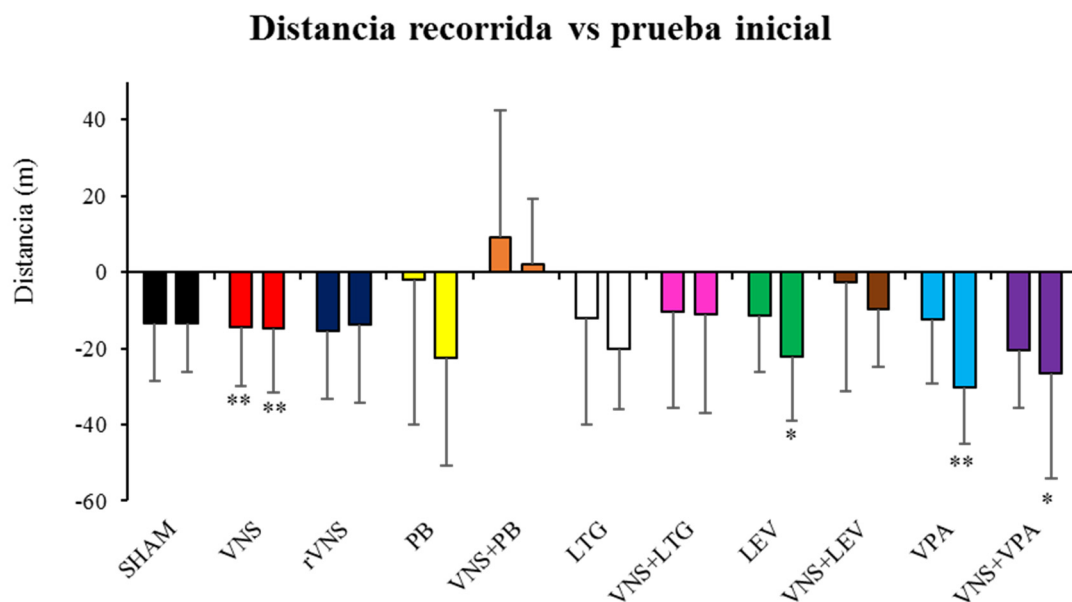


Figura 37. Distancia recorrida en las pruebas de campo abierto. Resultados obtenidos en los grupos SHAM, VNS, rVNS, PB, VNS+PB, LTG, VNS+LTG, LEV, VNS+LEV, VPA y VNS+VPA. Los datos de cada grupo se representan mediante dos barras, que corresponden a la diferencia media en distancia recorrida expresada en metros con respecto a la prueba inicial, tras la primera y la segunda semana de tratamiento, respectivamente. Las barras de error indican la hemidesviación estándar. “*” ($p < 0,05$); “**” ($p < 0,01$); “***” ($p < 0,001$).

En cuanto al **tiempo en el que el animal se mantiene inmóvil**, el software lo detecta de forma automática. De forma similar a lo que sucedió en relación a la distancia recorrida, en el grupo VNS+PB, los animales se mostraron más activos y se observó una disminución del tiempo medio que permanecieron inmóviles. Destaca un aumento muy significativo en los animales tratados con rVNS y VNS+VPA. También se describen diferencias estadísticamente significativas en los grupos PB, VNS+PB, VNS+LTG y

VPA. En el caso del ácido valproico, las diferencias se detectaron entre la primera y la segunda semana de tratamiento. No se detectaron diferencias entre grupos (**Figura 38**).

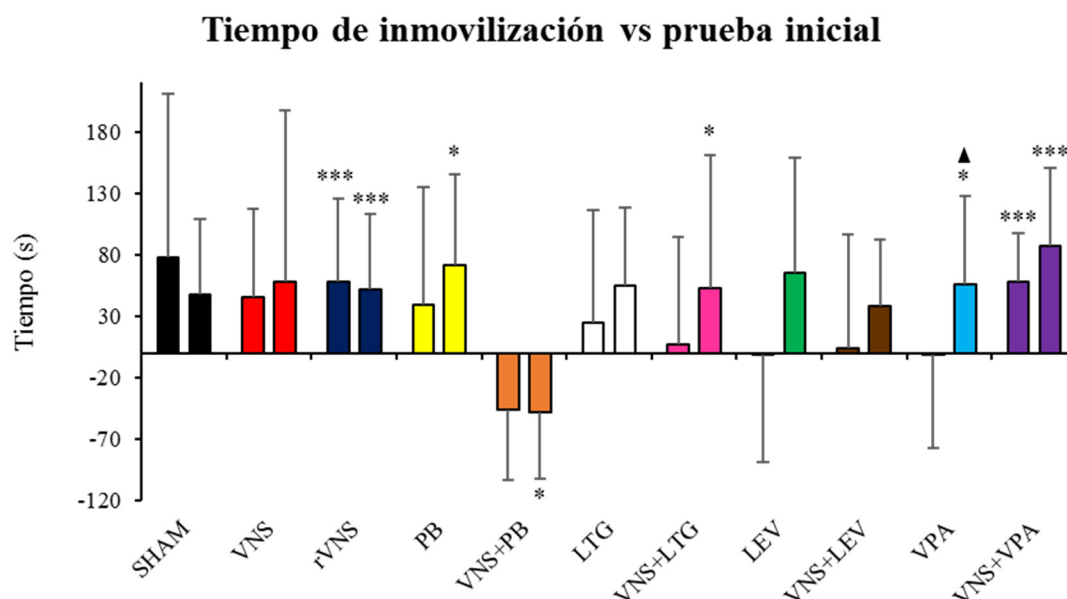


Figura 38. Tiempo de inmovilización en las pruebas de campo abierto. Resultados obtenidos en los grupos SHAM, VNS, rVNS, PB, VNS+PB, LTG, VNS+LTG, LEV, VNS+LEV, VPA y VNS+VPA. Los datos de cada grupo se representan mediante dos barras, que corresponden a la diferencia media en tiempo de inmovilización expresada en segundos con respecto a la prueba inicial, tras la primera y la segunda semana de tratamiento, respectivamente. Las barras de error indican la hemidesviación estándar. ‘▲’ representa la diferencia entre la segunda y la tercera prueba. ‘*’ ($p < 0,05$); ‘***’ ($p < 0,001$). ‘▲’ ($p < 0,05$).

En relación con las **elevaciones de los animales (rearings)**, se observó una reducción en la segunda y tercera prueba, tanto en los animales tratados con FAE como en los tratados con VNS. Sólo se produjo un aumento en los animales tratados con VNS+LEV en la segunda semana de tratamiento. Aparentemente, parece que esta disminución fue más leve en los GASH tratados con rVNS que en los del grupo con VNS, en los que las diferencias fueron altamente significativas. Además, se detectaron diferencias en los SHAM y en los sujetos tratados con PB, LEV y VNS+VPA. En el grupo tratado con VPA, además, se detectaron diferencias entre la primera y la segunda semana de tratamiento (**Figura 39**).

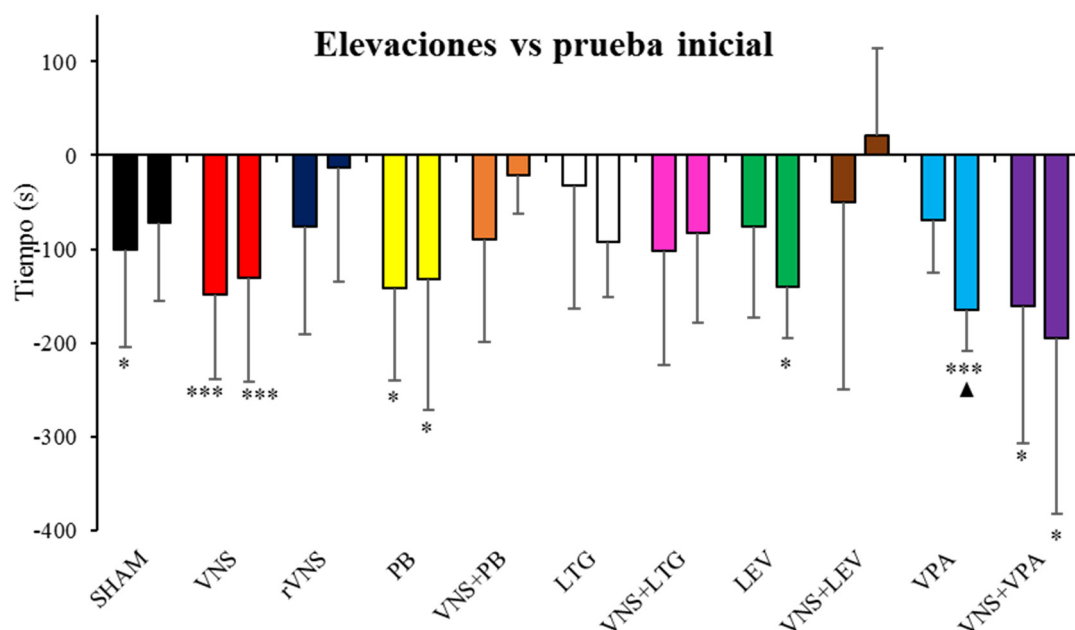


Figura 39. Elevaciones en las pruebas de campo abierto. Resultados obtenidos en los grupos SHAM, VNS, rVNS, PB, VNS+PB, LTG, VNS+LTG, LEV, VNS+LEV, VPA y VNS+VPA. Los datos de cada grupo se representan mediante dos barras, que corresponden a la diferencia media en el tiempo que los animales permanecen erguidos expresada en segundos con respecto a la prueba inicial, tras la primera y la segunda semana de tratamiento, respectivamente. Las barras de error indican la hemidesviación estándar '▲' representa la diferencia entre la segunda y la tercera prueba. '*' ($p < 0,05$); '**' ($p < 0,01$); '***' ($p < 0,001$); '▲' ($p < 0,05$).

En general, los animales mostraron mayor tiempo de **acicalamiento o 'grooming'** con el tratamiento. En el caso de los GASH que portaron el sistema de VNS, estuviera conectado o no, el tiempo de acicalamiento fue mayor en el registro realizado a los 7 días de tratamiento que en el llevado a cabo el día de la eutanasia. En los grupos tratados con FAE, se observó la tendencia opuesta. El mayor aumento en el acicalamiento se produjo en los animales tratados con VPA, y especialmente en los tratados con VNS+VPA (**Figura 40**).

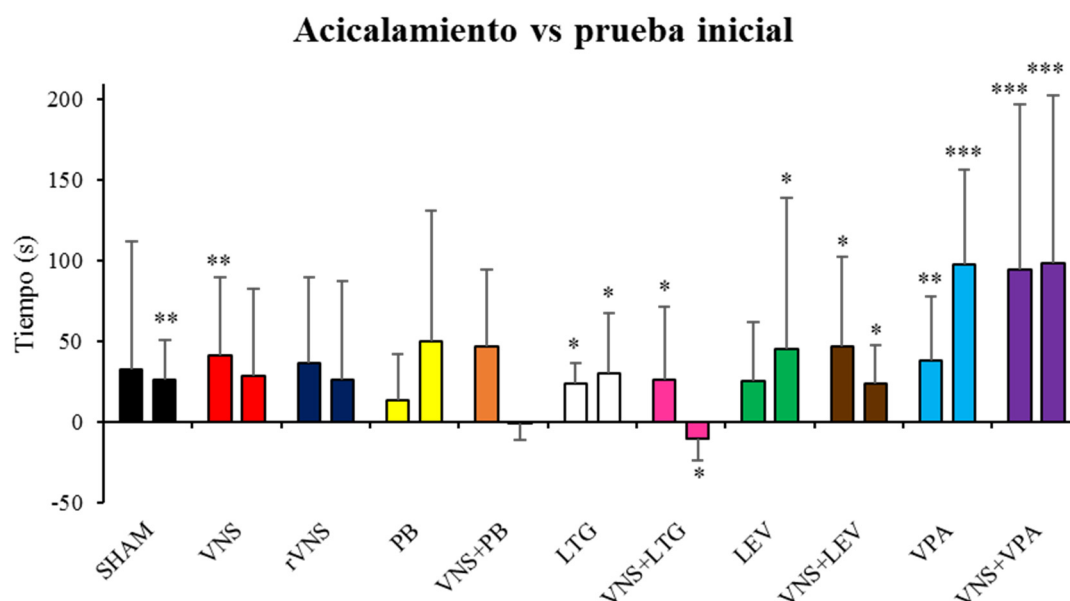


Figura 40. Acicalamiento en las pruebas de campo abierto. Resultados obtenidos en los grupos SHAM, VNS, rVNS, PB, VNS+PB, LTG, VNS+LTG, LEV, VNS+LEV, VPA y VNS+VPA. Los datos de cada grupo se representan mediante dos barras, que corresponden a la diferencia media en tiempo de acicalamiento expresada en segundos con respecto a la prueba inicial, tras la primera y la segunda semana de tratamiento, respectivamente. Las barras de error indican la hemidesviación estándar. “*” ($p < 0,05$); “**” ($p < 0,01$); “***” ($p < 0,001$).

Por último, se contabilizaron las **entradas en la zona central** del campo abierto (**Figura 41**) y el **tiempo** que los sujetos experimentales pasaron en dicha zona (**Figura 42**). Aunque el número de entradas a la zona central aumentó ligeramente en todos los grupos salvo en el caso de los animales tratados con lamotrigina, el tiempo de permanencia en ella mostró mayor variabilidad. El tratamiento con PB y VPA se asoció con un mayor tiempo en la zona central del campo. No se detectaron diferencias en la comparación entre grupos.

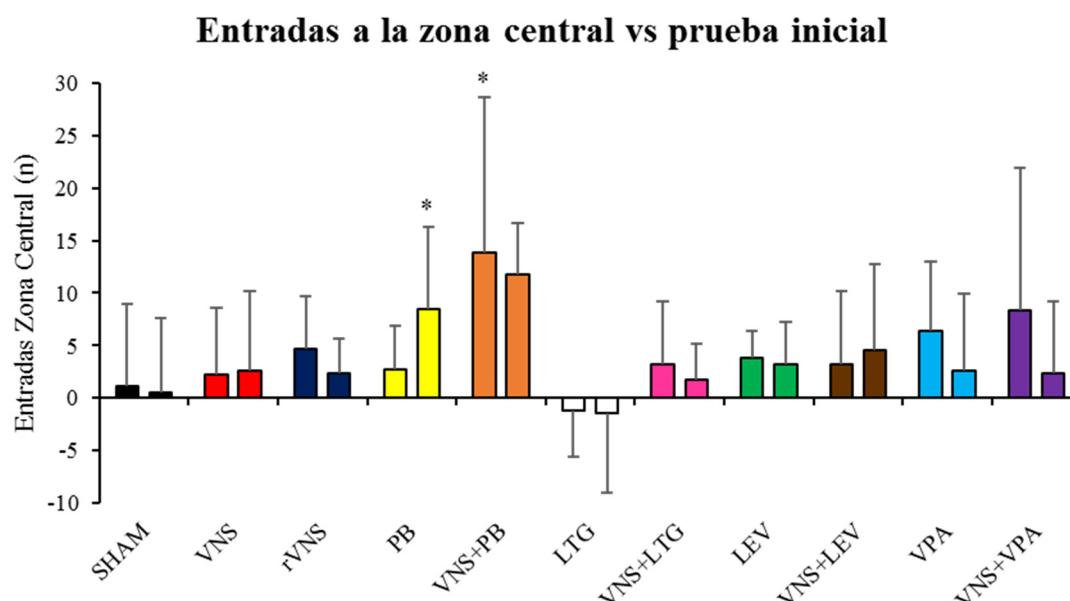


Figura 41. Entradas a la zona central en las pruebas de campo abierto. Resultados obtenidos en los grupos SHAM, VNS, rVNS, PB, VNS+PB, LTG, VNS+LTG, LEV, VNS+LEV, VPA y VNS+VPA. Los datos de cada grupo se representan mediante dos barras, que corresponden a la diferencia media en el número de entradas a la zona central del campo con respecto a la prueba inicial, tras la primera y la segunda semana de tratamiento, respectivamente. Las barras de error indican la hemidesviación estándar. ‘*’ ($p < 0,05$); ‘**’ ($p < 0,01$); ‘***’ ($p < 0,001$).

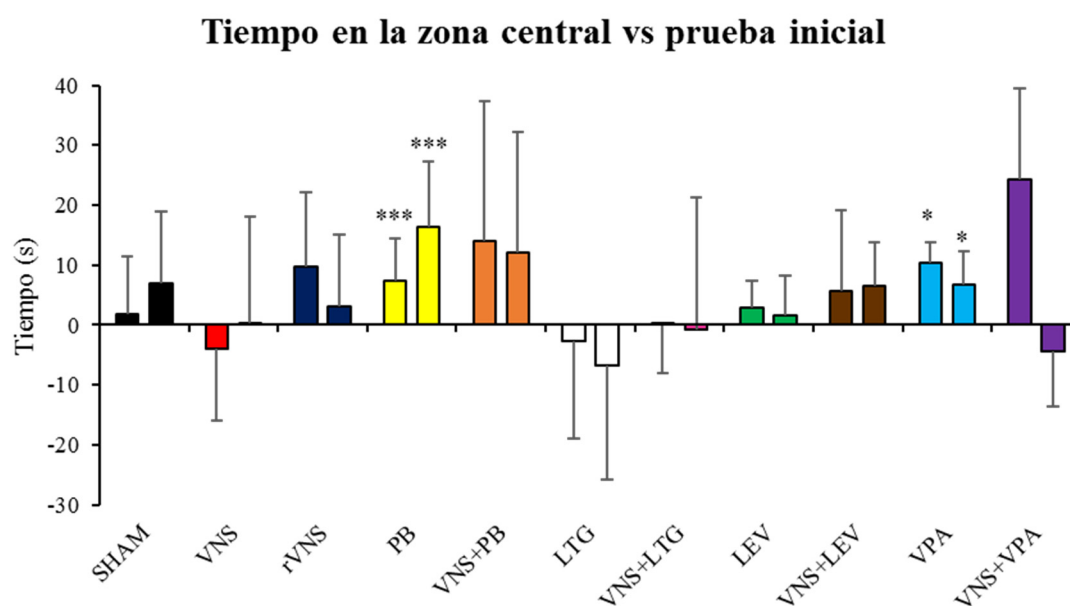


Figura 42. Tiempo en la zona central en las pruebas de campo abierto. Resultados obtenidos en los grupos SHAM, VNS, rVNS, PB, VNS+PB, LTG, VNS+LTG, LEV, VNS+LEV, VPA y VNS+VPA. Los datos de cada grupo se representan mediante dos barras, que corresponden a la diferencia media en tiempo de permanencia en la zona central expresada en segundos con respecto a la prueba inicial, tras la primera y la segunda semana de tratamiento, respectivamente. Las barras de error indican la hemidesviación estándar. ‘*’ ($p < 0,05$); ‘***’ ($p < 0,001$).

6.7 Evaluación del estado general

Se observó una reducción del peso tras la cirugía, tanto en los grupos tratados con VNS (derecha e izquierda) como en el grupo SHAM. Dicha reducción fue similar en ambos grupos, y se situó entre el 7 y el 11 por ciento con respecto al peso inicial el día 7 de tratamiento. Se observó una mayor recuperación del peso inicial durante la segunda semana de tratamiento. Esta tendencia fue más pronunciada en los GASH tratados con rVNS (**Figura 43A**)

La administración de FAE no produjo alteraciones severas en el peso, aunque el tratamiento con levetiracetam y lamotrigina se asoció con una ligera pérdida de peso tras la primera inyección (**Figura 43B**). El tratamiento combinado de VNS y FAE muestra cómo el peso mínimo de los animales se sitúa entre los días 3 y 4 del tratamiento, momento a partir del cual comienza a observarse en los GASH/Sal una tendencia a recuperar el peso inicial. En este caso, la mayor pérdida de peso se observó en los sujetos tratados con VNS y lamotrigina. En conjunto, el tratamiento combinado de VNS y FAE produjo una recuperación más rápida y mayor del peso que en los animales que recibieron únicamente VNS (**Figura 43C**).

No se observaron efectos secundarios de ninguna otra clase en los animales, por lo que deducimos que la cirugía y los parámetros de estimulación fueron bien tolerados.

En cuanto a los datos referentes al hemograma y parámetros bioquímicos, se observaron alteraciones entre los animales tratados con VNS y el grupo SHAM. Sin embargo, en el caso de los animales tratados con FAE, destacan las alteraciones observadas en los animales tratados con levetiracetam, en los cuales se observan niveles muy altos de bilirrubina y transaminasas. En los GASH tratados con VNS+LEV, no se observaron estas alteraciones. Por otra parte, no fue posible la realización del hemograma en los animales tratados con rVNS debido a una avería en el aparato en el que iba a realizarse la lectura que se ha prolongado durante meses. Los resultados se muestran en la **Tabla 5**.

En cuanto a la sedación ocasionada por los fármacos, se observó una sedación leve en los animales tratados con ácido valproico y en un caso puntual del grupo tratado con lamotrigina ($S_{di} = 1$). No se observaron alteraciones asociadas al fenobarbital o al levetiracetam.

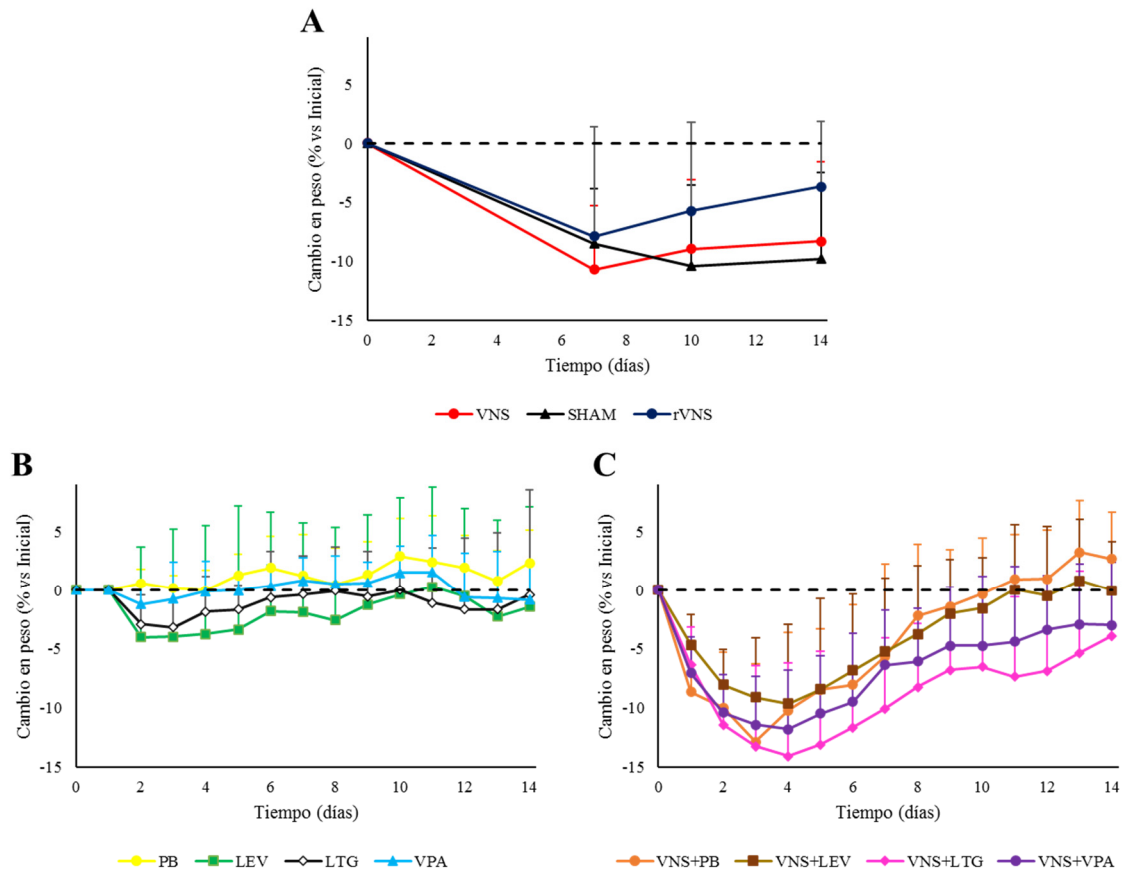


Figura 43. Cambios en el peso a lo largo del tratamiento. **A.** Comparación de los cambios en el peso de los grupos VNS, rVNS y SHAM. **B.** Datos de los GASH tratados con cada uno de los FAE utilizados. **C.** Efecto de cada una de las combinaciones de VNS+FAE en el peso. En todos los casos los datos se representan como la media + hemidesviación estándar. La línea discontinua muestra el peso obtenido el día 0 (cirugía o inicio del tratamiento).

Tabla 5. Parámetros hematológicos y bioquímicos

Parámetros	Valores de referencia	SHAM	VNS	rVNS
Bioquímica				
Proteína total (g/dl)	4 - 8	6,5 ± 1	6,5 ± 0,8	6 ± 0,4
Albumina (g/dl)	2,5 - 4	2,7 ± 0,5	2,7 ± 0,5	2,5 ± 0,6
Bilirrubina total (mg/dl)	0,1 - 0,9	1,1 ± 0,9	0,6 ± 0,5	0,7 ± 0,3
Aspartato transaminasa (UI/L)	53 - 124 U/L	76,5 ± 42,3	68,3 ± 45,1	64,7 ± 23,5
Alanina transaminasa (UI/L)	21 - 50 U/L	51,5 ± 12,1	57,8 ± 42,8	49 ± 13
Hemograma				
Hemoglobina (g/dl)	10 - 18	13,63 ± 3,21	13,54 ± 4,38	
Hematocrito (%)	36 - 60	38,20 ± 9,35	43,11 ± 6,94	
Glóbulos rojos céls/μl (10 ⁶)	10 ⁶	6,69 ± 1,95	7,82 ± 1,13	
Plaquetas/μl (10 ³)	800 - 1800	1119 ± 546	897 ± 440	
Glóbulos blancos (10 ³)	3 - 11	6,45 ± 1,33	6,06 ± 3,27	

Parámetros	PB	VNS+PB	LTG	VNS+LTG
Bioquímica				
Proteína total (g/dl)	6,8 ± 0,9	6,5 ± 0,3	7,2 ± 0,4	6,5 ± 0,2
Albumina (g/dl)	2,7 ± 0,4	2,8 ± 0,3	2,9 ± 0,3	2,4 ± 0,3
Bilirrubina total (mg/dl)	1,8 ± 1,8	0,9 ± 0,6	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,2
Aspartato transaminasa (UI/L)	73,3 ± 83,3	66,8 ± 39,5	59,2 ± 49,6	32 ± 4,6
Alanina transaminasa (UI/L)	86,7 ± 62,6	51,5 ± 23,4	57,8 ± 26,3	59 ± 35,7
Hemograma				
Hemoglobina (g/dl)	13,16 ± 1,09	14,56 ± 1,29	13,62 ± 0,68	13,93 ± 0,38
Hematocrito (%)	39,26 ± 3,75	44,88 ± 6,28	40,12 ± 3,31	42,37 ± 2,34
Glóbulos rojos céls/μl (10 ⁶)	6,19 ± 0,51	7,12 ± 1,17	6,44 ± 0,57	7 ± 0,47
Plaquetas/μl (10 ³)	854 ± 518	1346 ± 229	1588 ± 517	1514 ± 184
Glóbulos blancos (10 ³)	6,19 ± 2,22	6,04 ± 1,66	6,83 ± 2,95	5,44 ± 1,43

Parámetros	LEV	VNS+LEV	VPA	VNS+VPA
Bioquímica				
Proteína total (g/dl)	7,7 ± 0,1	6,6 ± 0,3	7,1 ± 0,6	5,9 ± 0,5
Albumina (g/dl)	3,2 ± 0,6	2,6 ± 0,5	2,7 ± 0,3	2,2 ± 0,4
Bilirrubina total (mg/dl)	3,9 ± 1,4	0,9 ± 0,6	1,7 ± 1,6	0,9 ± 0,5
Aspartato transaminasa (UI/L)	227,4 ± 84,2	67,8 ± 64,8	61 ± 43,9	35,2 ± 12,6
Alanina transaminasa (UI/L)	101,8 ± 25,9	62,4 ± 36	65,5 ± 28,7	30,2 ± 10,4
Hemograma				
Hemoglobina (g/dl)	14,97 ± 1,72	13,92 ± 1,08	12,33 ± 2,73	12,58 ± 1,14
Hematocrito (%)	41,20 ± 5,96	40,76 ± 2,70	33,43 ± 8,07	34,18 ± 9,56
Glóbulos rojos céls/μl (10 ⁶)	6,15 ± 0,97	6,82 ± 0,47	5,6 ± 1,68	5,34 ± 1,39
Plaquetas/μl (10 ³)	604 ± 447	1560 ± 454	1025 ± 627	1015 ± 235
Glóbulos blancos (10 ³)	4,06 ± 1,73	5,32 ± 1,05	5,22 ± 2,99	3,53 ± 2,30

6.8 Registros electroneurofisiológicos

En los registros obtenidos del vago cervical se confirmó la presencia y el efecto cíclico de los trenes de pulsos sobre el nervio, los cuales pueden aislarse, como se representa en la **Figura 44**. Además, se confirmó el mantenimiento de la integridad del nervio.

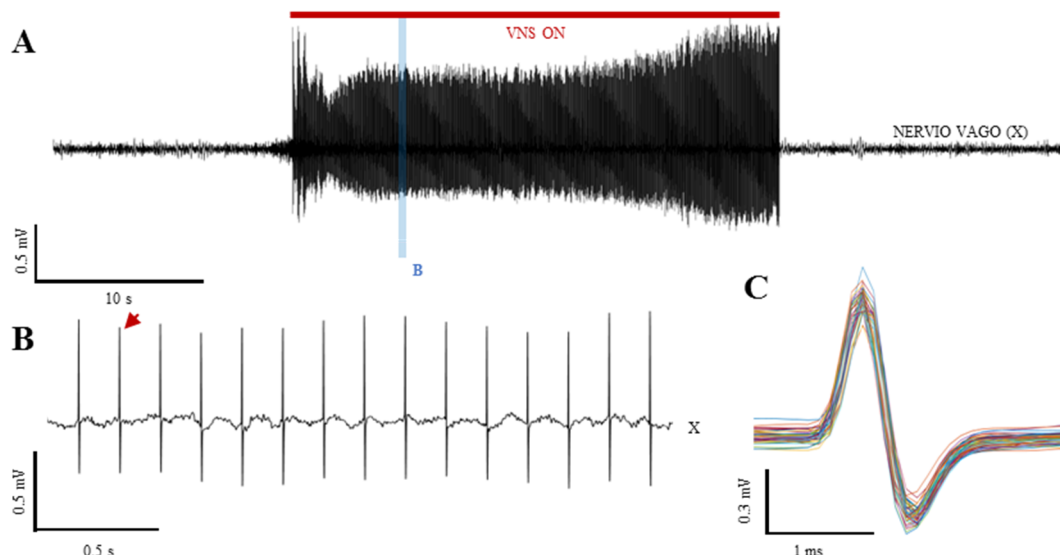


Figura 44. Registros electrofisiológicos del nervio vago (X) durante el protocolo de VNS. A. Potenciales de campo local obtenidos antes, durante, y después de la fase ON de la estimulación. La línea roja representa la duración del estímulo, mientras que la banda azul, muestra el intervalo de los registros mostrado en B. B. Breve muestra de los registros mostrados en A, mostrando el estímulo eléctrico con más detalle. La flecha señala uno de estos pulsos. C. Detalle de 50 pulsos individuales mostrando la forma de la onda.

Finalmente, en las muestras tomadas del nervio vago cervical tratado y no tratado, no se observó ningún daño relevante en la estructura y celularidad del propio nervio (**Figura 45**).

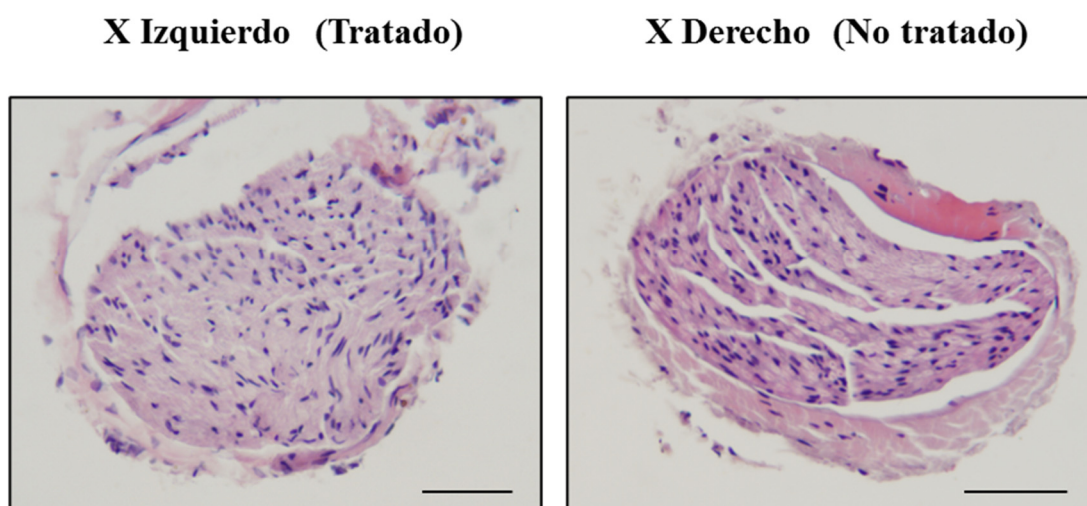


Figura 45. Nervio vago cervical del hámster GASH/Sal. A la izquierda, nervio vago izquierdo (X) sometido a VNS. A la derecha, nervio vago derecho sin tratar. Las instantáneas corresponden al mismo animal experimental. Escala de 20 μ m. Tinción de hematoxilina-eosina.

6.9 Expresión de marcadores inflamatorios

6.9.1 ELISA

En los animales tratados con VNS, se observó una reducción estadísticamente significativa de los niveles de IL-1 β en corteza ($p = 0,01$) y cerebelo ($p = 0,002$). En el tronco encefálico, se observó esta tendencia, pero con una mayor variabilidad en los datos obtenidos ($p = 0,077$). (**Figura 46A**). En el caso del grupo de animales tratados con VNS, se hizo una comparativa adicional entre los animales que mostraron cSI = 3 y cSI = 0 en el último registro. No se observaron diferencias en los niveles de IL-1 β entre estos subgrupos (**Figura 46B**). En plasma, sin embargo, la detección del kit fue deficiente, por lo que los resultados no han sido incluidos en este trabajo.

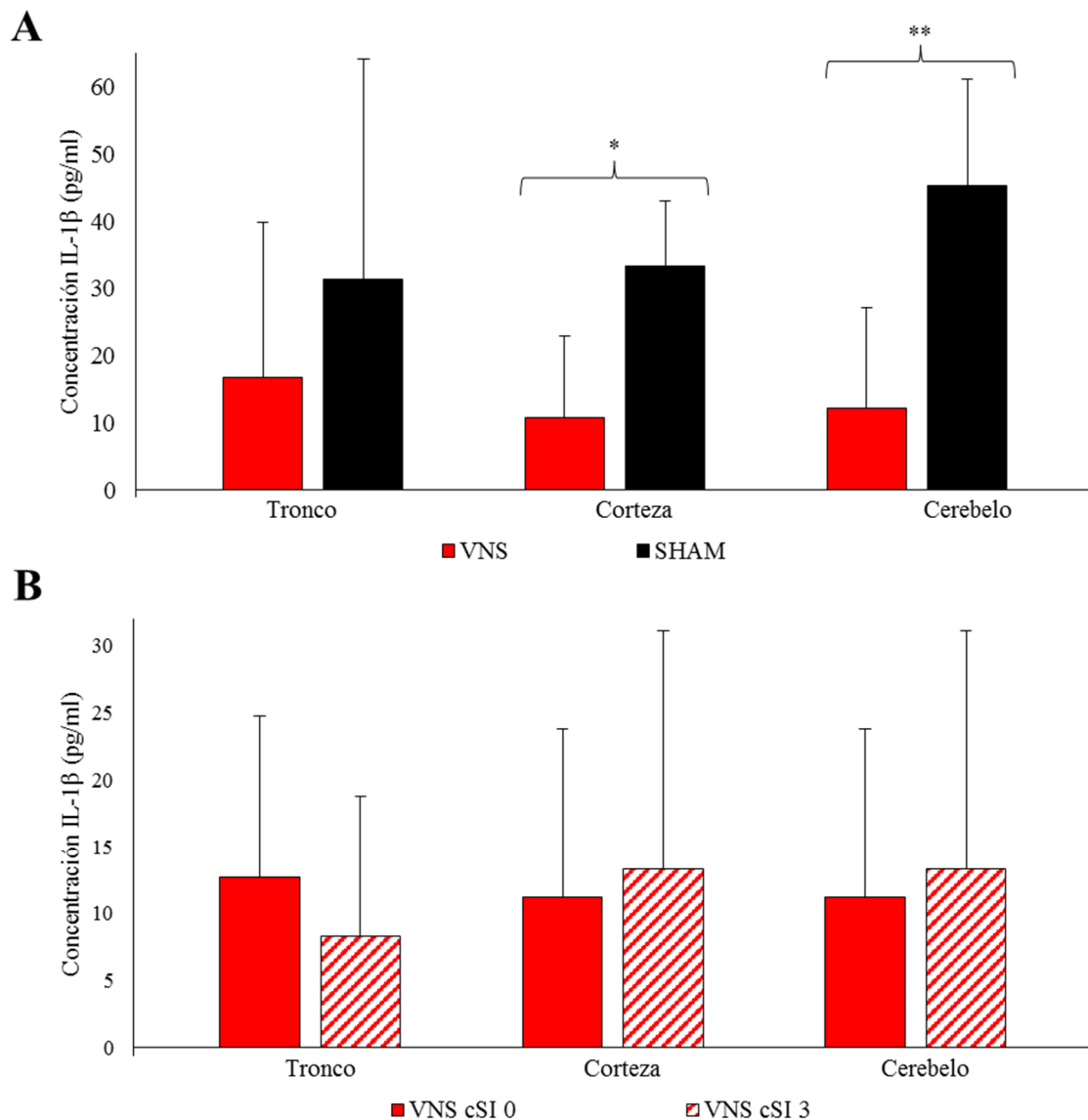


Figura 46. Niveles de IL-1 β en tronco encefálico, corteza y cerebelo. **A.** Comparativa de la concentración de IL-1 β en el grupo tratado con VNS con respecto al SHAM. **B.** Resultados del grupo tratado con VNS, distinguiendo en función del índice de severidad de las crisis (cSI) del último registro. Los resultados se expresan en pg/mL. Las barras verticales indican la hemidesviación estándar. “*” ($p < 0,05$); “**” ($p < 0,01$).

6.9.2 Matrices de marcadores inflamatorios

Se observó un efecto antiinflamatorio de la VNS en tejido nervioso, con una reducción estadísticamente significativa en la expresión de IL-1 β , TNF- α , MCP-1, MMP-2, y MMP-3. Sin embargo, no se detectó ningún cambio significativo en los marcadores inflamatorios medidos en plasma. Los datos obtenidos se muestran en las **Figuras 47-49** y en las **Tablas 6 y 7**.

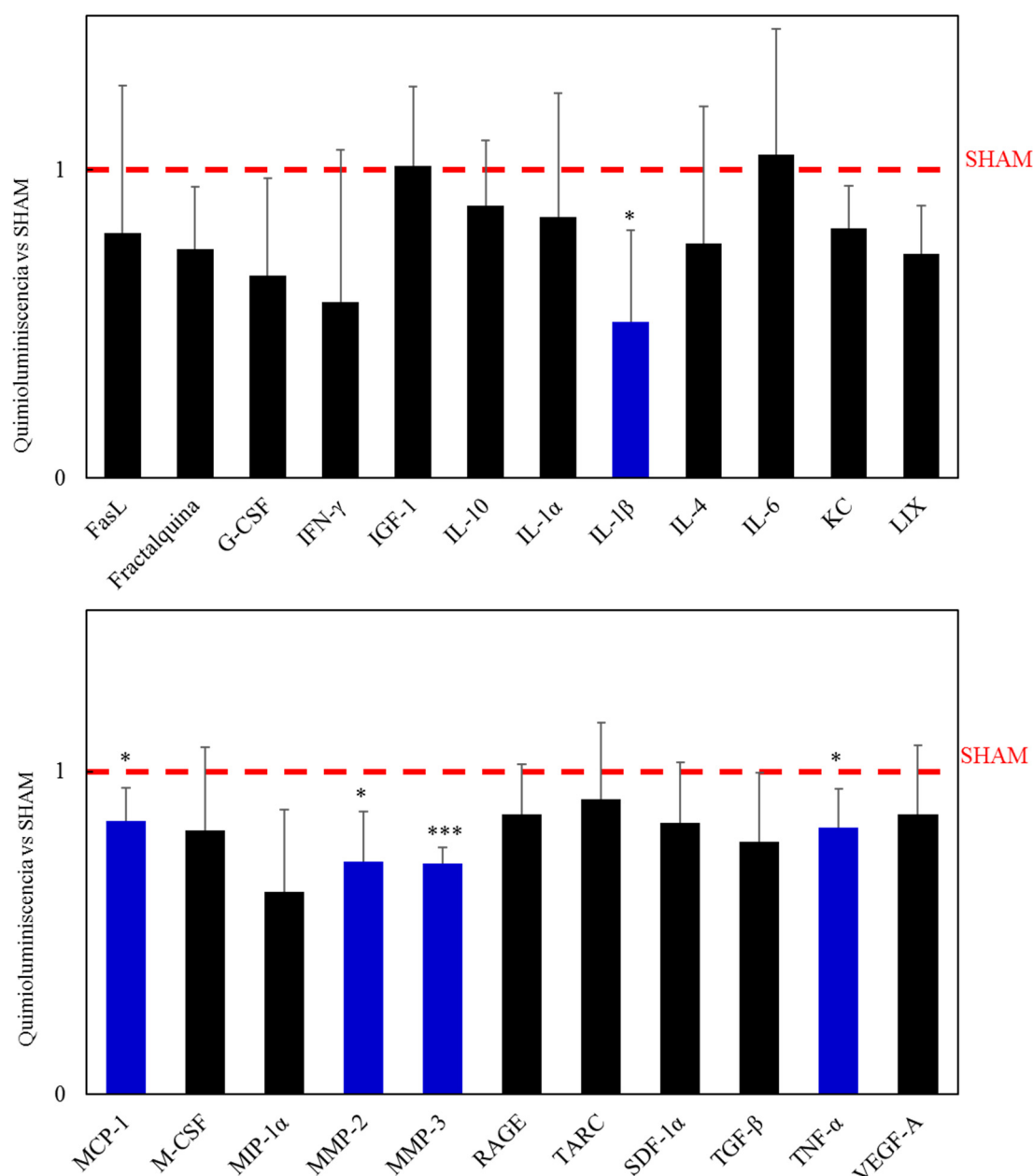


Figura 47. Perfil de marcadores inflamatorios en cerebro de GASH/Sal tratados con VNS. Las barras muestran la media del grupo tratado con VNS normalizada con respecto al grupo SHAM y el control positivo de cada membrana. Los marcadores para los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas (IL-1 β , MCP-1, MMP-2, MMP-3, TNF- α) se representan en azul. El resto se muestran en negro. Las barras de error representan la hemidesviación estándar. '*' ($p < 0,05$); '***' ($p < 0,001$).

Tabla 6. Valores del perfil de marcadores inflamatorios en tejido nervioso. Los datos se muestran como la media $\pm$ desviación estándar. Los marcadores para los que se halló significación estadística aparecen sombreados. Los p-valores se obtuvieron mediante una prueba *t* de student.

	Normalización con control +		Normalización con SHAM	p-valor
	VNS	SHAM	VNS	VNS vs SHAM
FasL	0,14 $\pm$ 0,08	0,17 $\pm$ 0,08	0,79 $\pm$ 0,48	0,49
Fractalquina	0,23 $\pm$ 0,06	0,31 $\pm$ 0,09	0,74 $\pm$ 0,2	0,13
G-CSF	0,17 $\pm$ 0,08	0,25 $\pm$ 0,06	0,66 $\pm$ 0,32	0,078
IFN-γ	0,11 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,07	0,57 $\pm$ 0,5	0,14
IGF-1	0,17 $\pm$ 0,04	0,17 $\pm$ 0,06	1,01 $\pm$ 0,26	0,94
IL-10	0,13 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,21	0,55
IL-1α	1,54 $\pm$ 0,73	1,81 $\pm$ 0,75	0,85 $\pm$ 0,4	0,55
IL-1β	0,08 $\pm$ 0,04	0,15 $\pm$ 0,06	0,51 $\pm$ 0,3	0,038 *
IL-4	0,11 $\pm$ 0,07	0,15 $\pm$ 0,05	0,76 $\pm$ 0,45	0,36
IL-6	0,12 $\pm$ 0,05	0,12 $\pm$ 0,03	1,05 $\pm$ 0,41	0,82
KC	0,49 $\pm$ 0,08	0,6 $\pm$ 0,19	0,81 $\pm$ 0,14	0,21
LIX	0,84 $\pm$ 0,18	1,15 $\pm$ 0,3	0,73 $\pm$ 0,16	0,062
MCP-1	0,82 $\pm$ 0,1	0,97 $\pm$ 0,1	0,85 $\pm$ 0,1	0,037 *
M-CSF	1 $\pm$ 0,32	1,23 $\pm$ 0,25	0,82 $\pm$ 0,26	0,23
MIP-1α	0,19 $\pm$ 0,08	0,3 $\pm$ 0,15	0,63 $\pm$ 0,25	0,13
MMP-2	0,2 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,07	0,72 $\pm$ 0,16	0,047 *
MMP-3	0,44 $\pm$ 0,03	0,62 $\pm$ 0,08	0,71 $\pm$ 0,05	0,00077 ***
RAGE	0,32 $\pm$ 0,06	0,37 $\pm$ 0,1	0,87 $\pm$ 0,15	0,35
TARC	0,38 $\pm$ 0,1	0,42 $\pm$ 0,07	0,91 $\pm$ 0,24	0,51
SDF-1α	0,53 $\pm$ 0,12	0,63 $\pm$ 0,14	0,84 $\pm$ 0,19	0,24
TGF-β	0,55 $\pm$ 0,15	0,7 $\pm$ 0,19	0,78 $\pm$ 0,21	0,17
TNF-α	0,22 $\pm$ 0,03	0,27 $\pm$ 0,03	0,83 $\pm$ 0,12	0,042 *
VEGF-A	0,13 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,08	0,87 $\pm$ 0,21	0,61

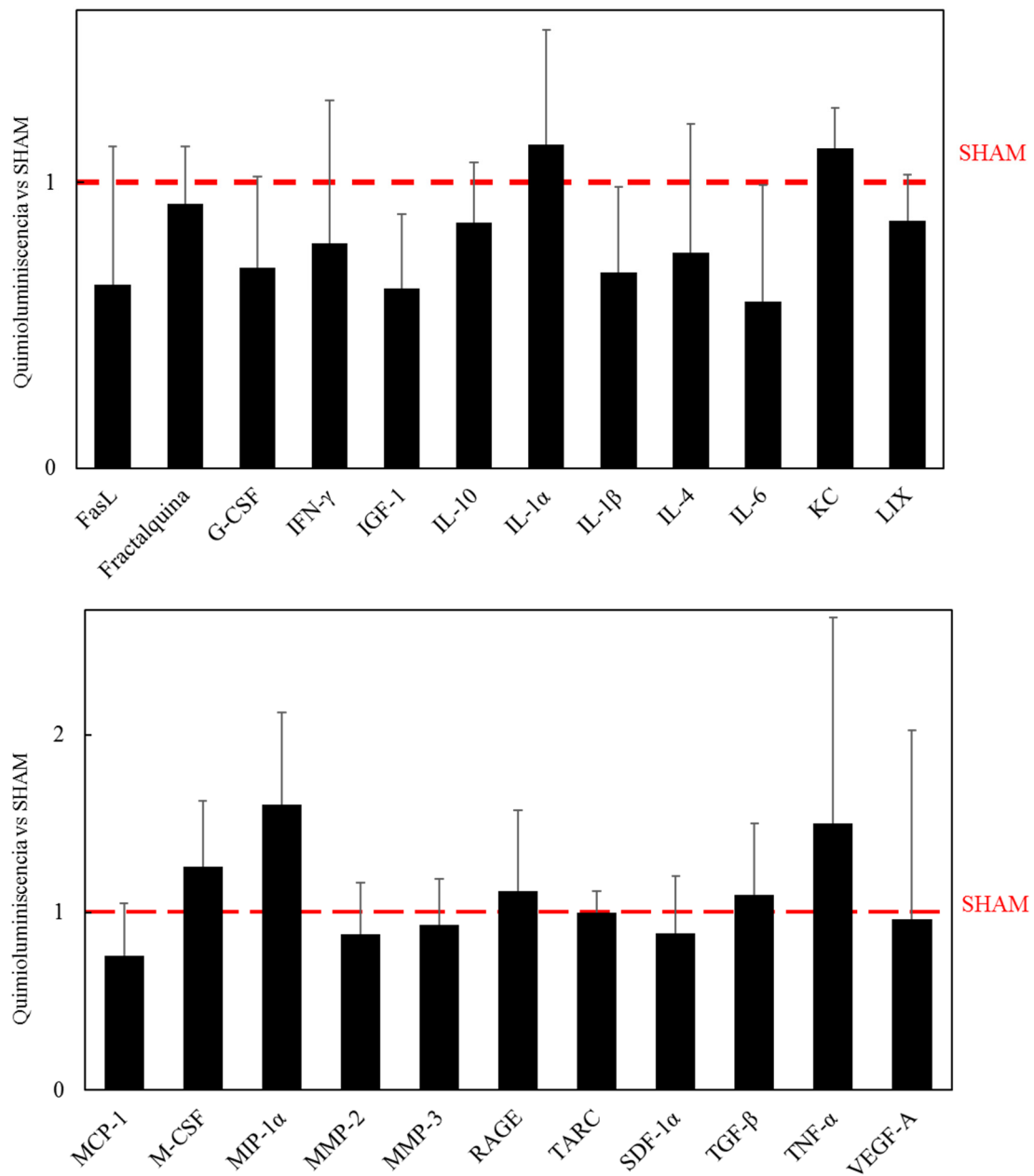


Figura 48. Perfil de marcadores inflamatorios en plasma de GASH/Sal tratados con VNS. Las barras representan los valores medios obtenidos en el grupo de GASH/Sal tratados con VNS, después de normalizarse con respecto al grupo SHAM y el control positivo de cada membrana. Las barras de error se corresponden con la hemidesviación estándar. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 7. Valores del perfil de marcadores inflamatorios en plasma. Los datos se muestran como la media $\pm$ desviación estándar. Los p-valores se obtuvieron mediante una prueba *t* de student. No se detectó significación estadística.

	Normalización con control +		Normalización con SHAM	p-valor
	VNS	SHAM	VNS	VNS vs SHAM
FasL	0,15 $\pm$ 0,15	0,24 $\pm$ 0,23	0,64 $\pm$ 0,64	0,5
Fractalquina	0,23 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,09	0,92 $\pm$ 0,15	0,65
G-CSF	0,24 $\pm$ 0,14	0,34 $\pm$ 0,25	0,7 $\pm$ 0,41	0,43
IFN-γ	0,20 $\pm$ 0,12	0,26 $\pm$ 0,3	0,79 $\pm$ 0,46	0,69
IGF-1	5,45 $\pm$ 2,7	8,66 $\pm$ 5,59	0,63 $\pm$ 0,31	0,25
IL-10	0,19 $\pm$ 0,09	0,22 $\pm$ 0,25	0,86 $\pm$ 0,43	0,79
IL-1α	1,44 $\pm$ 0,35	1,27 $\pm$ 0,36	1,13 $\pm$ 0,27	0,48
IL-1β	0,19 $\pm$ 0,14	0,27 $\pm$ 0,12	0,69 $\pm$ 0,52	0,36
IL-4	0,03 $\pm$ 0,04	0,04 $\pm$ 0,05	0,76 $\pm$ 0,98	0,73
IL-6	0,11 $\pm$ 0,11	0,19 $\pm$ 0,22	0,58 $\pm$ 0,55	0,45
KC	0,48 $\pm$ 0,19	0,43 $\pm$ 0,04	1,12 $\pm$ 0,44	0,61
LIX	0,85 $\pm$ 0,24	0,98 $\pm$ 0,34	0,87 $\pm$ 0,25	0,5
MCP-1	0,68 $\pm$ 0,27	0,89 $\pm$ 0,22	0,75 $\pm$ 0,3	0,21
M-CSF	0,80 $\pm$ 0,23	0,63 $\pm$ 0,13	1,26 $\pm$ 0,37	0,23
MIP-1α	0,18 $\pm$ 0,06	0,11 $\pm$ 0,02	1,61 $\pm$ 0,51	0,06
MMP-2	1,46 $\pm$ 0,49	1,66 $\pm$ 0,43	0,88 $\pm$ 0,3	0,52
MMP-3	0,36 $\pm$ 0,1	0,39 $\pm$ 0,03	0,93 $\pm$ 0,26	0,63
RAGE	0,37 $\pm$ 0,15	0,33 $\pm$ 0,1	1,12 $\pm$ 0,45	0,64
TARC	0,44 $\pm$ 0,06	0,45 $\pm$ 0,09	1 $\pm$ 0,13	0,96
SDF-1α	0,92 $\pm$ 0,34	1,04 $\pm$ 0,62	0,88 $\pm$ 0,32	0,7
TGF-β	0,78 $\pm$ 0,29	0,71 $\pm$ 0,13	1,1 $\pm$ 0,4	0,66
TNF-α	0,50 $\pm$ 0,39	0,33 $\pm$ 0,06	1,51 $\pm$ 1,15	0,42
VEGF-A	0,04 $\pm$ 0,05	0,04 $\pm$ 0,09	0,96 $\pm$ 1,07	0,97

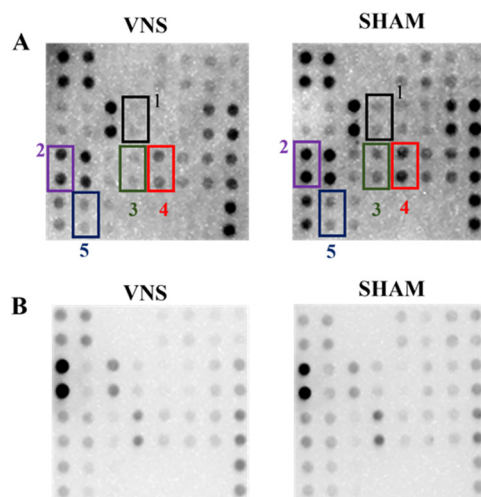


Figura 49. Captura de una matriz de marcadores inflamatorios de cada grupo y tejido estudiado. A. Ejemplo de los resultados obtenidos en hemisféalo izquierdo. Se resaltan con números y colores, los marcadores en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas. 1. IL-1 β (negro). 2. MCP-1 (morado). 3. MMP-2 (verde). 4. MMP-3 (rojo). 5. TNF- α (azul). B. Captura de los resultados obtenidos en plasma.

6.10 Estudio inmunohistoquímico de la expresión de c-Fos

Se observó un aumento en la expresión de c-Fos asociado a las crisis convulsivas en el núcleo del tracto solitario (NTS), observándose la mayor expresión de este marcador en los animales que presentaron crisis convulsivas a las 3 horas. A las 72 horas, se mantuvo esta activación de manera ligeramente menor. También, se detectó un ligero aumento de la expresión de c-Fos en el grupo con EA y VNS a las 3 horas y 72 horas antes de la eutanasia con respecto al control.

En el grupo control sin EA, no se detectó apenas expresión de c-Fos en el locus coeruleus (LC). Se observó un gran aumento de c-Fos asociado a las crisis. Tres horas después del último registro de las crisis, los animales tratados con VNS mostraron un menor número de células marcadas, probablemente como consecuencia de una menor severidad de las crisis. 72 horas después del registro de las crisis, se produjo una disminución tanto en número de neuronas marcadas como en la intensidad del marcaje. Sin embargo, la expresión de c-Fos no llegó a disminuir hasta sus niveles basales. No se han detectado diferencias en la expresión de c-Fos entre el grupo tratado con VNS y el grupo con EA 72 horas después de la inducción de crisis.

El núcleo dorsal del rafe (DR) mostró una actividad baja en condiciones basales. En esta área, también se observó que la mayor activación se produjo como consecuencia de las crisis convulsivas. En los animales tratados con VNS, se produjo una modulación de la actividad de este núcleo, ya que 3 horas después de la EA, los niveles de c-Fos fueron menores en comparación con su control, probablemente al asociarse a crisis de menor severidad. Sin embargo, 72 horas después de la EA, la actividad de esta zona fue ligeramente más elevada que en el grupo con EA.

Por último, en el núcleo parabraquial (PBN), también se observó menor marcaje en el grupo control sin estimulación acústica. En este caso, aunque en los grupos en los que se realizó estimulación auditiva también se produjo un aumento de la expresión de c-Fos y existe un efecto de la inducción de crisis, en los grupos tratados con VNS, la activación del PBN fue mayor.

En todos los núcleos, se contabilizaron por separado las células inmunorreactivas del lado izquierdo y derecho para detectar asimetrías en caso de producirse. No se detectaron diferencias entre ambos lados en ninguno de los grupos experimentales en ninguna de las áreas estudiadas.

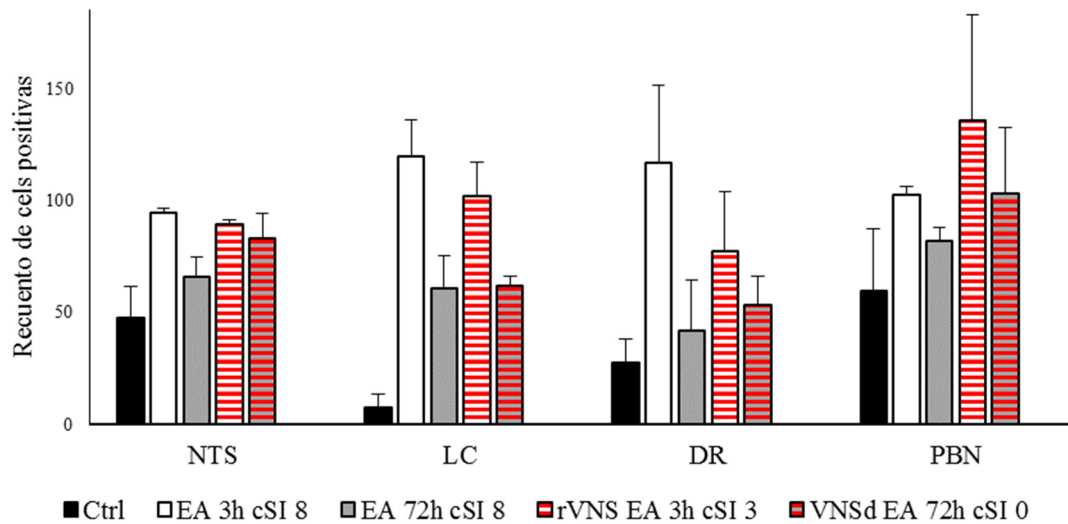


Figura 50. Recuento de neuronas inmunorreactivas a c-Fos en el núcleo del tracto solitario (NTS), locus coeruleus (LC), núcleo dorsal del rafe (DR) y área parabraquial (PBN). Las barras verticales representan la hemidesviación estándar.

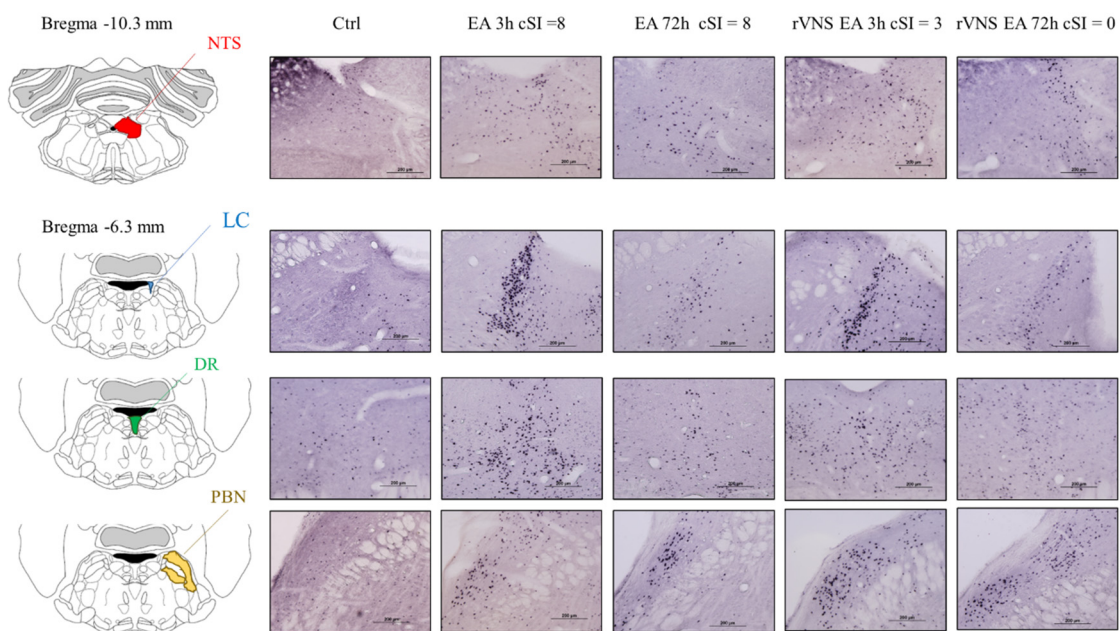


Figura 51. Fotografías que ilustran el marcaje de c-Fos en el núcleo del tracto solitario (NTS), locus coeruleus (LC), núcleo dorsal del rafe (DR) y área parabraquial (PBN) en cada uno de los grupos experimentales. Barra de calibración 200 µm.

7 Discusión

7.1 Discusión metodológica

El diseño experimental planteado es muy similar en todos los grupos experimentales, lo que facilita el análisis de los datos y la comparación entre grupos. Además, pese a haber utilizado un alto número de animales, existen dos factores que han contribuido a su reducción. En primer lugar, cada animal ha sido su propio control en relación con el comportamiento en condiciones basales y con las características de las crisis convulsivas. En segundo lugar, el conocimiento previo del efecto de los FAE en este modelo ha permitido la selección de forma casi directa de las dosis utilizadas en esa parte del estudio no necesitándose el grupo simulado de los animales tratados con la inyección del vehículo. Por otra parte, una pequeña fuente de variabilidad no significativa, son los cambios y mejoras introducidos en cuanto al protocolo quirúrgico y en los sistemas de estimulación, que se han ido implementando a medida que ha avanzado la tesis doctoral.

Con relación al protocolo de VNS, los parámetros de estimulación utilizados han mostrado eficacia y seguridad, con un buen efecto anticonvulsivo, aunque no se ha conseguido la ausencia total de crisis en todos los casos, ya que existe una proporción de animales que continuaron mostrando carrera salvaje tras el tratamiento de 14 días. Inicialmente, el diseño experimental estaba limitado a esa duración por cuestiones bioéticas. Quizá suceda algo similar a lo que se observa en la clínica, y la efectividad sea mejor tras un periodo de tiempo más prolongado. Desconocemos si los GASH/Sal que siguen mostrando carrera salvaje después de dos semanas de tratamiento continuarían haciéndolo si el experimento se prolongara. Por lo tanto, en futuros estudios nos parecería interesante explorar la posibilidad de realizar estudios de VNS manteniendo esta estimulación durante más tiempo. Sin embargo, hay que ser cuidadosos con la extensión de estos periodos de tratamiento en el GASH/Sal, debido a que la severidad de las crisis convulsivas puede disminuir a partir de los seis meses de edad (Muñoz et al., 2017). Por otro lado, también sería interesante establecer un diseño experimental en el que se probaran diferentes parámetros de estimulación cambiando individualmente cada uno de ellos, para tratar de determinar su impacto y rango efectivo. Este diseño era totalmente imposible en los primeros estudios ya que sólo disponíamos de un dispositivo clínico, y, posteriormente, durante el desarrollo del neuroestimulador de fabricación propia, debíamos monitorizar que el funcionamiento y efectos de las mejoras que se iban introduciendo, eran los esperados.

Sobre el protocolo de inducción de crisis, pensamos que, en posteriores estudios, podría reducirse el tiempo máximo de estimulación acústica a 30 segundos, ya que, por un lado, es muy poco frecuente que los animales que muestran carrera salvaje después de 15 segundos desarrollen crisis convulsivas tónico-clónicas, y lo único que se consigue prolongando el estímulo es alargar la carrera salvaje. Por otro lado, los animales que no reaccionan con carrera salvaje en los 30 primeros segundos del estímulo, ya no lo hacen.

En cuanto al análisis neuroetológico, el software Ethomatic permite realizar un análisis detallado de las crisis convulsivas y el comportamiento de los animales y es un enfoque necesario, pero presenta algunas limitaciones. Por un lado, se trata de un proceso muy laborioso, el software que utiliza es muy antiguo y precisa de una actualización. Estamos trabajando por mejorar y facilitar una automatización que evite la construcción de fluxogramas manualmente y evite las caídas del programa. Por otra parte, la propia construcción de los diagramas a veces ofrece información que puede no ser muy relevante, sobre todo cuando tratamos con grupos de experimentación con un tamaño muestral elevado. Por ejemplo, es suficiente con que un comportamiento aparezca una sola vez en los datos para que se refleje en el etograma. Al utilizar la frecuencia como un valor absoluto, y no relativo, produce que a medida que aumenta la “n”, los rectángulos tengan una apariencia cada vez más alargada, provocando una distorsión. Además, un número elevado de observaciones suele favorecer la aparición de mayor cantidad de asociaciones entre comportamientos, como sucede con otros métodos estadísticos cuando el tamaño muestral es grande. Por otro lado, tiene un componente subjetivo, además de por la diferencia que puede existir entre observadores, por la obligatoriedad de elegir únicamente uno entre varios comportamientos que pueden estar sucediendo simultáneamente. También, existe la posibilidad de que la posición en la que se sitúe el animal en momentos concretos dificulte su observación en vídeo al colocarse de espaldas o boca abajo, lo que se puede paliarse parcialmente mediante la colocación de espejos, realizando grabaciones simultáneas desde una posición cenital o realizando anotaciones cuando esto sucede. No obstante, el estudio neuroetológico es un método aceptado, que obliga a los investigadores a estudiar las crisis y el comportamiento de cada registro con profundidad, y permite bastante flexibilidad al poder añadir nuevos comportamientos al diccionario si es preciso y agrupar estos comportamientos en categorías. Asimismo, aporta información muy visual en casos en los que las diferencias son muy obvias, pero a la vez permite identificar diferencias sutiles que quizá de otra manera serían pasadas por alto.

En contrapartida, aunque los etogramas aporten información del comportamiento también en estado basal, existen otros métodos que proporcionan información adicional complementaria, como sucede en nuestro caso con la prueba de campo abierto. Como área de mejora, quizá podrían plantearse en el futuro otro tipo de pruebas de comportamiento en las que se exploren otras áreas sobre las que la VNS puede influir como pruebas de estrés o de aprendizaje. No serían necesario programas informáticos adicionales, únicamente habría que diseñar el recinto en el que se realizaran y proponer un diseño experimental adecuado, puesto que el software ANY-Maze es capaz de analizar pruebas de ese tipo.

Para la evaluación del estado general de los animales, pensamos que la metodología utilizada es suficiente, con el inconveniente de no haber podido realizar el hemograma de los animales tratados con VNS derecha, por problemas con el equipo. Sin embargo, dados los efectos y posibles riesgos de la VNS, nos habría gustado haber llevado a cabo

algún tipo de monitorización de la función cardiovascular. Sin embargo, esto implicaba la utilización de métodos invasivos mediante la implantación de diferentes sistemas, que, desde nuestro punto de vista, eran demasiado agresivos para el objetivo perseguido, teniendo en cuenta el resto de los procedimientos a realizar. En otros modelos, como la rata y el ratón, esto habría sido posible en cierta medida, porque es posible medir la presión arterial en la cola de forma muy sencilla mediante tensiómetros eléctricos aplicando presión sobre ella.

En el estudio sobre la combinación de FAE y VNS, se decidió utilizar una dosis de FAE cercana a la DE50, para observar posibles sinergias con la VNS.

En lo referente al estudio de marcadores inflamatorios, inicialmente optamos por realizar pruebas ELISA de los mismos individualmente, analizando primero los marcadores que consideramos más relevantes. Sin embargo, el hámster tiene la desventaja de que la mayoría de los kits y anticuerpos disponibles en el mercado no están diseñados para esta especie, y, además, la expresión de los marcadores suele ser baja, complicando su detección. Compramos kits de prueba para cuantificar IL-6 e IFN- γ sin éxito. Además, la detección de IL-1 β en plasma fue deficiente. Por este motivo, decidimos utilizar una matriz de marcadores inflamatorios, aunque éste estuviera específicamente diseñado para ratón y no para hámster, con el objetivo de medir varios marcadores a la vez y obtener resultados para, al menos, algunos de estos marcadores. Los resultados fueron muy satisfactorios. La principal diferencia entre los resultados obtenidos mediante esa matriz y una prueba ELISA, es que, mediante la primera se obtienen resultados cuantitativos, de concentración, y con la segunda cualitativos, de expresión relativa. Sin embargo, en nuestro caso, el análisis de la expresión relativa consideramos que es suficiente para estudiar diferencias entre grupos. En contrapartida, los resultados de marcadores en los que la expresión ha sido muy baja deben tomarse con cautela. Desconocemos si esta detección tan baja en comparación con el control positivo se debe a su baja expresión o es un problema de reconocimiento del anticuerpo. Por este motivo, y como complemento para futuros estudios en los que se estudiarán marcadores y rutas de señalización relacionadas, además de conservar el lisado del tejido no utilizado para Western Blot, se ha preservado la mitad derecha del encéfalo de los animales utilizados en esa parte de la tesis doctoral para la posterior obtención de ARN y análisis de RT-qPCR.

Sobre los registros del nervio vago, probablemente los filtros utilizados no fueran los más adecuados para un análisis de electroneurograma, pero en este caso, lo que nos interesaba era observar el artefacto de los trenes de pulsos y simplemente confirmar que la funcionalidad del nervio no se encontraba afectada. No obstante, se dispone de datos de 30 minutos antes de encender el neuroestimulador, y de 30 minutos después, que será interesante analizar con detalle, poniendo énfasis en la actividad del nervio en sí.

c-Fos es una proteína nuclear, producto del gen de expresión temprana *c-fos*, que dimeriza con la proteína c-Jun para formar el factor de transcripción AP-1, para activar

genes relacionados con diferenciación y proliferación celular, el aprendizaje, el control motor y el proceso cognitivo (Aparicio et al., 2022). c-Fos ha sido ampliamente utilizada como marcador de la actividad neuronal (Herrera & Robertson-F, 1996). En nuestro estudio, nos encontramos con la dificultad de separar correctamente el efecto de la VNS del efecto de las crisis en la expresión de c-Fos. Por un lado, es conocido que existe un aumento de la expresión de c-Fos en determinadas regiones cerebrales tras la inducción de crisis convulsivas (Barone et al., 1993; Morgan et al., 1987; Retchkiman et al., 1996). Además, algunas de estas zonas, como el locus coeruleus, también se postula que son activadas por la VNS (Groves et al., 2005). Por ese motivo, se estudió un grupo control sin provocación de crisis y sin tratamiento, y se incluyeron otros dos grupos experimentales en los que se indujo una única crisis 3 y 72 horas antes de la eutanasia, respectivamente. En el caso de los animales tratados con VNS, también fueron sacrificados a las 3 o a las 72 horas después del último registro de las crisis. De esta forma, 3 horas después de la inducción de las crisis, esperábamos detectar el máximo pico de la expresión de c-Fos, que se sitúa entre 30 minutos y 6 horas tras el estímulo, dependiendo de la región a estudiar y el modelo animal empleado (Cruz-Mendoza et al., 2022). Dado que la expresión de c-Fos en las áreas de interés en los controles sin exposición al sonido ha sido prácticamente nula, no esperábamos que 72 horas después de una única inducción de crisis, se continuara observando la expresión de c-Fos en áreas asociadas con crisis convulsivas, ya que se presuponía únicamente un efecto agudo. En futuros estudios, para determinar de manera más precisa el efecto de la VNS en la expresión de c-Fos, además de aumentar el tamaño muestral, sería más adecuado completar el estudio realizando esta evaluación en GASH/Sal tratados con VNS que en ningún momento hubieran sido expuestos a ningún tipo de estrés o estimulación auditiva e incluir además un grupo SHAM. Por otra parte, sería interesante tener el dato de cómo es la expresión de c-Fos en las áreas estudiadas en un hámster dorado de una cepa no epiléptica, y valorar también si el estrés que supone la exposición al sonido modifica la expresión de c-Fos en esas áreas, o son sólo las crisis convulsivas. Por otro lado, existen otras áreas cerebrales más rostrales en las que podría evaluarse el efecto de la VNS dada su posible implicación el mecanismo de acción de la terapia y que no han sido evaluadas en este estudio preliminar. También, podría incorporarse al estudio la evaluación de Δ FosB, un factor de transcripción de la misma familia que c-Fos, pero cuya expresión se mantiene en el tiempo, por lo que es más indicado para detectar efectos crónicos sobre la actividad neuronal (Madsen et al., 2006; Nestler, 2015), y que ya ha sido utilizado por algunos investigadores para estudiar el efecto de la VNS sobre la actividad neuronal (Cunningham et al., 2007; Furmaga et al., 2012). Finalmente, consideramos que el revelado con sulfato de níquel y amonio facilita el conteo de las neuronas inmunorreactivas, al igual que permite establecer diferencias en cuanto a la intensidad de este marcaje, en comparación con el uso de DAB únicamente, ya que el fondo obtenido fue tenue.

7.2 El hámster GASH/Sal como modelo para el estudio de la VNS.

La estimulación del nervio vago ha producido un efecto anticonvulsivo en el GASH/Sal muy notable sin haberse detectado efectos secundarios. En cuanto a la seguridad de la técnica, no se produjo mortalidad en la cirugía y ha sido bien tolerada por los animales experimentales. No se han observado reacciones adversas ni conductas anómalas en los animales, tampoco como consecuencia de los parámetros de estimulación. Por lo tanto, creemos que el modelo experimental desarrollado tiene potencial utilidad para el estudio de los mecanismos de acción de la VNS.

Además, creemos que el modelo experimental desarrollado presenta una serie de ventajas con respecto a otros descritos en la literatura (Aalbers et al., 2011; Noller et al., 2019). En primer lugar, es un modelo en el que se utiliza un sistema implantable (Canal-Alonso et al., 2022). Por consiguiente, el animal se encuentra libre y se elimina la necesidad de estimulación externa o sedación. Además, permite el uso de los parámetros utilizados habitualmente en la clínica, así como la estimulación crónica intermitente a lo largo del tiempo, tal como se realiza en los pacientes, no solo durante unas horas o minutos al día. Igualmente, de forma teórica, permitiría la exploración de nuevos parámetros, modificando la programación del neuroestimulador. Asimismo, ofrece la posibilidad de realizar estudios más largos que los reflejados en esta tesis, dado que se estima que la autonomía del dispositivo VNS diseñado es de alrededor de un año, y el dispositivo de neuroestimulación, al ser pequeño, es mucho más tolerable para el animal.

El GASH/Sal tiene la ventaja de ser un modelo genético que presenta convulsiones reflejas audiogénicas. Dicho de otra forma, las crisis no son espontáneas (Muñoz et al., 2017). Por un lado, esto podría ser un impedimento dado que la etiología de las crisis es diferente a la mayoría de las epilepsias humanas (Okudan & Özkara, 2018), pero, por otro lado, permite a los investigadores decidir a la carta cuándo se inducen las crisis y cuándo no. Esta característica aumenta las posibilidades a la hora de proponer un diseño experimental y evita la variabilidad e interferencias debidas a las crisis que pueden producirse en cualquier momento en otros modelos (Kandratavicius et al., 2014). Igualmente, las convulsiones no son provocadas por estímulos eléctricos o químicos, evitando así posibles interferencias entre su inducción y el estudio de tratamientos. Además, tenemos la posibilidad de realizar registros electrofisiológicos mediante cirugía estereotáctica para estudiar los efectos electrofisiológicos de la VNS sobre la actividad neuronal en el modelo. Finalmente, el modelo propuesto, puede servir también para evaluar el efecto de las comorbilidades asociadas a la epilepsia, presentes en modelos experimentales similares de epilepsia audiogénica (Alves et al., 2022; Garcia-Cairasco et al., 1998; Lazarini-Lopes et al., 2021).

De forma alternativa, el sistema de VNS desarrollado podría utilizarse para estudiar los efectos y mecanismos de acción de la VNS en otras enfermedades y procesos no

relacionados con la epilepsia, en otros modelos experimentales en función de los objetivos perseguidos.

7.3 Sistema de estimulación del nervio vago de fabricación propia vs sistema comercial

Tal y como se refleja en el apartado correspondiente a resultados, no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al efecto anticonvulsivo, entre el generador de pulsos clínico o el que se ha diseñado durante la tesis doctoral. En ambos casos, se observa un claro efecto anticonvulsivo del tratamiento. Además, el sistema diseñado se ha mostrado seguro y no se han descrito reacciones adversas en los animales de experimentación, ya que todos los materiales utilizados en el aislamiento del sistema de fabricación propia han demostrado ser biocompatibles.

El objetivo de desarrollar un sistema de VNS para roedores vino dado principalmente por una cuestión bioética, dado que los sistemas clínicos existentes en el mercado presentan un tamaño que no es adecuado para los animales de experimentación. En este aspecto, con el diseño final se ha conseguido una reducción del peso de más del 50% en el peor de los casos y, por tanto, supone un menor estrés para los sujetos experimentales. No obstante, la reducción del volumen ha sido moderada, ya que pese a que se ha producido una reducción en la longitud y anchura del sistema, al optar por una placa base circular y colocar la batería bajo ella, no se ha conseguido reducir la altura del sistema.

Esta reducción del tamaño, aparte de obtenerse mediante un proceso de optimización de los componentes utilizados (por ejemplo, reducción del grosor de la placa base), se consigue fundamentalmente a costa de la eliminación de las características más complejas propias del sistema clínico, y que se han considerado como prescindibles para nuestro diseño experimental. Por ejemplo, la reducción más importante de tamaño se ha conseguido mediante la limitación de la duración de la batería, que no precisa ser superior a 5 años como en la clínica. Además, se han eliminado otras opciones que en otros diseños experimentales podrían ser interesantes, como la posibilidad de controlar y modificar a la carta en cualquier momento los parámetros de estimulación mediante un programador externo o un imán, así como verificar de forma inmediata valores de impedancia o el correcto funcionamiento del sistema. En el caso del sistema de fabricación propia, los parámetros de estimulación han de estar prefijados y, una vez ensamblado el generador de pulsos, únicamente se enciende con un imán, y se verifica la puesta en marcha por el parpadeo de un led. Finalizados los experimentos, más allá de poder realizar una verificación rápida de que no se ha agotado la batería del sistema probando si el imán vuelve a encender el led, si existe alguna duda o problema, es necesario desensamblar el sistema y que sea inspeccionado por un técnico. Además, el sistema de VNS diseñado, no presenta características propias de otros sistemas clínicos todavía más modernos, como la posibilidad de realizar una programación diurna y nocturna, usar algoritmos de detección de variables como la frecuencia cardíaca, o hacer

incrementos planificados de la intensidad aplicada. Es decir, en muchos aspectos, se trata de una versión limitada del sistema clínico.

El sistema de VNS diseñado presenta dos ventajas adicionales muy interesantes que amplían las posibilidades de investigación. En primer lugar, es mucho más económico que un dispositivo clínico. Los sistemas clínicos cuestan miles de euros, mientras que el coste del sistema diseñado se sitúa alrededor de los doscientos, a lo que hay que sumar en ambos casos el precio de los electrodos de estimulación. De este hecho, se desprende otra ventaja fundamental, y es que permite disponer de mayor cantidad de sistemas de VNS. Por lo tanto, también permite obtener un tamaño de muestra mayor en los experimentos y posibilita realizar los procedimientos en mayor cantidad de animales al mismo tiempo. En nuestro caso particular, durante las primeras etapas de investigación dependimos de la cesión de sistemas explantados de pacientes por parte de LivaNova, la casa comercial fabricante de los sistemas VNS clínicos. Una vez se puso a punto el diseño del generador de pulsos se eliminó la circunstancia que limitaba el número de sujetos experimentales que se pueden utilizar en los estudios.

Con todo, a pesar del buen resultado final, el proceso de desarrollo del sistema de estimulación ha sido largo y ha supuesto varios años de trabajo. Han existido diferentes versiones de la placa base y hemos tenido problemas con el consumo y tamaño de la batería, así como con el aislamiento del sistema. Los problemas de la batería se solucionaron con mejoras en los componentes y en la programación, a la vez que se fueron diseñando placas base cada vez más finas. En cada uno de estos pasos se verificó en pruebas *in vivo* que el funcionamiento del sistema seguía siendo comparable al del sistema clínico. En el aislamiento de los sistemas también se produjo una evolución, ya que comenzamos utilizando siliconas odontológicas (Hydrosilicone Fast Putty Soft, KDM, Madespa S.A., España), que no eran adecuadas. En muchas ocasiones no eran del todo estancas y se filtraba líquido al interior provocando gran cantidad de fallos. Posteriormente, esta silicona fue sustituida por el elastómero de silicona Sylgard™ y se consiguió disminuir de forma muy notoria el volumen y el peso. No obstante, en ocasiones se formaban microburbujas y el aislamiento no era perfecto y podían seguir existiendo problemas de forma ocasional. Finalmente, se añadió como aislamiento intermedio adicional una carcasa de resina. Con la combinación de estos avances, se fue consiguiendo una mayor reutilización de los sistemas. Actualmente, la vida media de los sistemas está limitada en la mayor parte de casos por la vida de los electrodos, que pueden emplearse entre dos y cuatro sujetos experimentales, dependiendo del cuidado con el que se haya llevado a cabo su manipulación, e incluso en ese momento, se podría reutilizar la placa base desoldando el electrodo, cambiando la batería y volviendo a realizar el aislamiento.

En resumen, podemos concluir que se ha conseguido el diseño de un sistema de VNS que puede sustituir al sistema clínico siempre que el diseño experimental, las cuestiones prácticas y las razones bioéticas aconsejen su utilización.

7.4 Estimulación del nervio vago izquierdo vs derecho

La VNS está únicamente autorizada para ser aplicada en el nervio vago cervical izquierdo. Esto se debe a que el nervio vago derecho tiene un efecto más pronunciado sobre el nodo sinusal, que constituye el marcapasos fisiológico del corazón; mientras que el izquierdo ejerce su función principalmente sobre el nodo aurículo-ventricular. Por lo tanto, se postuló que la estimulación del vago derecho tendría más efectos secundarios. Además, en los modelos caninos realizados durante el desarrollo de la terapia, la estimulación del vago derecho (rVNS) se asoció a un riesgo de bradicardia (Ardell & Randall, 1986). Por ello, la rVNS ha quedado descartada en epilepsia salvo casos excepcionales, y ha sido relegada a un tratamiento en fase de investigación experimental en enfermedades cardiovasculares (Capilupi et al., 2020). Actualmente, los ensayos clínicos en fase III que han empleado rVNS eferente para su posible utilización en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca no han mostrado los beneficios esperados (Dusi & De Ferrari, 2021).

Las diferencias entre la rVNS y la VNS en epilepsia han sido estudiadas en algunos trabajos con animales, aunque no son muy numerosos. En primates no humanos, aunque con parámetros diferentes a los habitualmente utilizados, se ha descrito la ausencia de efectos no deseados a nivel cardíaco mediante la rVNS (Lockard et al., 1990). Por otra parte, en rata se ha descrito que la inducción de bradicardia se produce mediante la activación de fibras C, (Paintal, 1973), que no son necesarias para los efectos anticonvulsivos de la terapia (Krahl et al., 2001), ni se activan con los parámetros de VNS utilizados habitualmente (Elam et al., 1993). Además, se ha descrito un efecto anticonvulsivo similar, independientemente del lado en el que se aplicó la VNS en un modelo de rata con crisis inducidas con PTZ (Krahl et al., 2003). En otro estudio en modelos de epilepsia en cerdos, tampoco se detectaron diferencias entre el efecto anticonvulsivo de la estimulación del nervio vago derecho y el izquierdo (Tubbs et al., 2007). Por otro lado, en estudios de VNS transcutánea, el lado estimulado no influye (Lampros et al., 2021). Además, los estudios de EEG y de expresión de cFos, sugieren que la estimulación unilateral del vago provoca respuestas simétricas bilaterales (Attenello et al., 2015). Igualmente, el efecto antiinflamatorio parece ser independiente de la lateralidad de la estimulación (Olofsson et al., 2015). Sin embargo, otros investigadores han defendido la existencia de una lateralización en las vías vagales. Destacan investigaciones recientes que sugieren que la VNS aplicada sobre el vago derecho y no sobre el izquierdo, activa el sistema dopaminérgico mesencefálico (Brougher et al., 2021).

No obstante, se ha aplicado rVNS con éxito en tres ocasiones muy excepcionales en la clínica, tanto en adultos (Navas et al., 2010), como en niños (McGregor et al., 2005; Spuck et al., 2008). Se trata de casos en los que la VNS ha mostrado una buena respuesta, pero ha sido necesario repetir la intervención quirúrgica por diferentes motivos: infecciones, sangrado, fibrosis o escaso espacio disponible para volver a acceder al nervio y reimplantar el electrodo en una posición próxima, fallos en el

neuroestimulador o efectos secundarios como parálisis de las cuerdas vocales o bradicardia. En estos pacientes, se han reflejado respuestas positivas pero heterogéneas, y es difícil determinar si el efecto sobre las crisis es mejor o peor comparada con la VNS al uso. Además, se ha monitorizado la función cardíaca y respiratoria, y los resultados no han sido concluyentes, ya que algunos investigadores han observado alteraciones asociadas a la rVNS (McGregor et al., 2005; Spuck et al., 2008), mientras que otros no (Navas et al., 2010). Sin embargo, todos coinciden en la importancia de monitorizar la función cardiovascular en caso de aplicar rVNS, ya que no está estandarizada y aprobada para un uso más amplio. Finalmente, existe la discusión sobre si se debería excluir o no de la rVNS a los pacientes que no son candidatos a la VNS izquierda.

En nuestro caso, los resultados son consistentes con lo observado en la investigación básica y en la clínica, ya que la rVNS mostró efecto anticonvulsivo y se ha considerado como un procedimiento seguro en el GASH/Sal. Sin embargo, el efecto de la rVNS fue levemente inferior al de la VNS izquierda en nuestro modelo. La principal diferencia entre grupos es que hubo un sujeto en el grupo rVNS que mantuvo las crisis de severidad máxima al final del experimento (1 de 7, 14.2%), mientras que en el grupo tratado con VNS en ninguno de los sujetos se mantuvieron las crisis de severidad máxima. Todo ello se traslada a un índice cSI más elevado y una tasa de respuesta total ligeramente inferior en el grupo rVNS con respecto al VNS, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos. Dada la respuesta observada en la mayoría de los animales, cabe la posibilidad de que se haya producido algún fallo en la cirugía o en el funcionamiento del neuroestimulador que no ha sido identificado en el sujeto que mantuvo las crisis convulsivas.

En el grupo tratado con rVNS se observó una recuperación del peso inicial más rápida con respecto al grupo tratado con VNS. Esto quizá podría achacarse a un menor tiempo de cirugía en el grupo tratado con rVNS, ya que los experimentos de rVNS se realizaron al final, cuando el procedimiento quirúrgico estaba mucho más entrenado o incluso a una posible asimetría en la inervación del tubo digestivo.

En la prueba de campo abierto, la mayor parte de las diferencias observadas en los grupos VNS y rVNS con respecto a la primera prueba en el campo son similares a las detectadas en el grupo SHAM, por lo que dedujimos que la mayor parte de los efectos observados sobre el comportamiento se deben a la cirugía y a la repetición de la prueba, y no a los parámetros de estimulación. No obstante, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la distancia recorrida en el grupo VNS y no en los otros dos grupos mencionados, lo cual puede relacionarse con diferencias en el tamaño muestral, mucho mayor en el caso del grupo VNS. Sin embargo, es bastante llamativo que en el grupo tratado con rVNS aumentaron significativamente los comportamientos de inmovilidad. Esto no se ha detectado ni en el análisis neuroetológico ni al observar el comportamiento general de los animales. Además, los parámetros bioquímicos no mostraron alteraciones, por lo que no creemos que se deba a ningún tipo de efecto

secundario no detectado. Por otra parte, la reducción en las elevaciones fue más sutil en los animales del grupo rVNS. En general, a medida que avanzó el trabajo de investigación, cada vez se implantaron los neuroestimuladores en una posición más posterior, ya que facilita la inmovilización y manipulación de los animales durante los experimentos y evita problemas de infección de la herida y de desplazamiento del generador de pulsos hacia un costado y, por ello se presupone más cómodo para los animales. No podemos achacar las diferencias observadas entre estos dos grupos experimentales a un efecto diferencial ejercido por la estimulación de uno u otro nervio.

Aunque no se ha marcado como objetivo en esta tesis, los resultados obtenidos abren la puerta a la posibilidad de explorar si la VNS bilateral pudiera resultar útil para el tratamiento de la epilepsia y fuera más efectiva que la estimulación unilateral. Así, en la bibliografía, únicamente se encuentran estudios básicos que han utilizado la estimulación bilateral para evaluar el reflejo inflamatorio de forma aguda (Olofsson et al., 2015), o para estudiar diferentes técnicas para paliar la obesidad mórbida, con la diferencia de que en este caso la estimulación se aplica en el vago abdominal (Roslin & Kurian, 2001; Yao et al., 2018).

En nuestro modelo experimental, hemos probado a realizar VNS bilateral aplicando los mismos parámetros de la VNS unilateral de forma simultánea a cada nervio. La cirugía fue similar a la de implantación del sistema de estimulación unilateral y se utilizaron los mismos neuroestimuladores desarrollados durante esta tesis doctoral. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron los esperados. Se produjo mortalidad en los animales entre las 12 y las 96 horas posteriores al procedimiento quirúrgico y los sujetos mostraron síntomas muy similares a los que se han descrito en la literatura al practicarse una vagotomía doble cervical en otras especies: disnea, edema pulmonar, expulsión de sangre por vías respiratorias y asfixia (Farber, 1937), con un tiempo de supervivencia medio algo mayor que el descrito en estos trabajos. En un animal SHAM se realizó la cirugía de VNS con el neuroestimulador desconectado y no se produjeron estos fenómenos, por lo que estos efectos se podrían asociar a la propia estimulación, descartándose potenciales daños ocasionados por una posible lesión del nervio. Para descartar que los parámetros de estimulación fueran demasiado potentes, se decidió reducir a la mitad la intensidad de corriente, a pesar de lo cual, los resultados obtenidos fueron similares. Es probable que la estimulación bilateral invasiva, como consecuencia también del propio bloqueo anodal, sea incompatible con la vida. Esto, además, podría explicar por qué 30 años después de los inicios de la aplicación clínica de la VNS, todavía nadie ha publicado nada al respecto. Por ejemplo, Krahel et al., en el año 2003, en la publicación en la que afirmó que el efecto anticonvulsivo de la VNS y la rVNS es similar en un modelo de rata, reflejó en la discusión que en próximas publicaciones iban a probar el efecto anticonvulsivo de la VNS bilateral. Veinte años después de dicho trabajo, no se ha publicado nada referente a ello. Es probable que estos investigadores y otros que trabajan en líneas de investigación afines hayan obtenido resultados negativos, similares a los obtenidos en nuestros experimentos, y estos datos hayan quedado abandonados en un cajón. Estos resultados sobre VNS bilateral son bastante

interesantes, puesto que la VNS auricular transcutánea sí que se aplica de forma bilateral, y, aunque los parámetros difieran y se aplique de forma mucho más intermitente, esto podría justificarse con el argumento de que no existe el potencial problema de bloquear las funciones del vago eferente al carecer la rama auricular del vago de implicación en procesos vitales. En próximos experimentos, además de probar a realizar el mismo protocolo con intensidades todavía menores, repetiremos el mismo procedimiento, pero sin sincronizar las fases ON de la estimulación en cada nervio, y compararemos su efecto con la estimulación unilateral adaptando los ciclos ON/OFF. Creemos que estos datos nos aportarán la información necesaria para poder determinar la potencial aplicabilidad o no de la VNS bilateral. Por otro lado, también es posible que estos parámetros sean demasiado agresivos como para aplicarlos de forma brusca, pero que sea tolerable si se sube la intensidad poco a poco, como se hace en la clínica con la VNS al uso.

7.5 Sinergia con fármacos antiepilépticos

La VNS es una terapia que se aplica en casos de epilepsia refractaria. Por lo tanto, los pacientes que se someten a ella han recibido tratamiento farmacológico y mayoritariamente continúan recibéndolo. Sin embargo, es frecuente que en los estudios clínicos en los que se analiza el efecto de la terapia, éstos se centren en el efecto sobre las crisis y se obvie el impacto sobre la medicación. En la bibliografía, se pueden encontrar trabajos que muestran que los pacientes tratados con VNS muestran una reducción en el consumo de FAE (Martorell-Llobregat et al., 2022). Sin embargo, en otros estudios no se ha detectado este cambio (Ryvlin et al., 2014), o incluso se observa lo opuesto, con un aumento de la medicación (Arcand et al., 2017; Kuba et al., 2009). Además, el efecto de la VNS no suele ser inmediato y tarda en producirse unos meses. Durante este periodo, hay pacientes que modifican su tratamiento farmacológico, lo que podría afectar al propio efecto de la VNS, aunque en un estudio retrospectivo se determinó que estos cambios en la dosis y los FAE utilizados, no influyen en los resultados de la VNS (García-Pallero et al., 2017). Otros autores han recogido mejores resultados con la VNS cuando el tratamiento con FAE no se modifica (Orosz et al., 2014). En el extremo opuesto, también hay autores que defienden que una vez el efecto de la VNS es estable, si la respuesta es buena, se debería eliminar el tratamiento farmacológico lo antes posible (Grioni & Landi, 2019). Sobre el análisis de tipos concretos de FAE, destaca un estudio reciente que reflejó que la combinación con moduladores de la glicoproteína SV2A o inhibidores de canales lentos de sodio se asociaban con un mejor control de las crisis tras la VNS (Winter et al., 2023). Otro estudio, que también evaluó el impacto de diferentes tipos de FAE, no encontró sinergias con ningún fármaco en concreto (Labar, 2002). Del mismo modo, no se han descrito interacciones no deseadas de la VNS con los FAE. Por lo tanto, no existe consenso, y sigue habiendo interrogantes en cuanto a las interacciones entre ambas formas de tratamiento.

En nuestro estudio, en los grupos tratados con FAE, se consiguió el objetivo buscado de observar un efecto anticonvulsivo evidente, pero sin alcanzar una inhibición total de las crisis, para así comparar su efectividad combinada con VNS. Partíamos con ventaja, ya que conocíamos, por investigaciones previas del grupo, el efecto anticonvulsivo de los fármacos utilizados a diferentes dosis en el GASH/Sal, por lo que no fue muy complicado seleccionarlos (Barrera-Bailón et al., 2013, 2017; Cabral-Pereira et al., 2021). En este caso, hemos completado lo que conocíamos añadiendo, además de los efectos sobre las crisis en un estudio crónico, los efectos sobre el comportamiento con la prueba de campo abierto, sobre los parámetros bioquímicos y hematológicos, y sobre la farmacocinética en sangre. Los resultados obtenidos son similares a lo esperado con algunas excepciones. En primer lugar, la farmacocinética de algunos FAE reveló su máxima concentración en sangre a tiempos algo más cortos con respecto a estudios previos. En segundo lugar, el tratamiento con levetiracetam se asoció a alteraciones en los niveles de transaminasas y bilirrubina, fenómeno que no había sido observado anteriormente. En tercer lugar, el efecto anticonvulsivo del levetiracetam fue mejor que el obtenido en estudios anteriores en los que fue administrado de forma aguda. En la literatura, se describe que el levetiracetam no tiene efecto en estudios agudos en modelos de roedores (Löscher & Schmidt, 1988), pero sí en estudios crónicos y de kindling (Löscher et al., 1998), lo que respalda nuestros resultados. Por último, la lamotrigina, tuvo un efecto anticonvulsivo menor que en estudios anteriores, pero únicamente disponíamos de datos de su administración aguda por vía intraperitoneal. En el caso de la lamotrigina, sí que disponíamos de datos de experimentos de administración crónica, pero en este caso el FAE fue administrado por vía oral, y a mayor dosis.

En los grupos tratados con VNS y FAE se produjo una reducción más temprana de las convulsiones tónico-clónicas que la observada en los animales tratados solamente con VNS. Por otro lado, el tratamiento combinado no aumentó el número de GASH/Sal que mostraron ausencia de carrera salvaje con respecto al grupo que recibió solo VNS. Igualmente, el índice de severidad cSI obtenido al final del experimento en los grupos tratados con VNS y FAE fue similar al del grupo tratado solo con VNS.

La combinación de VNS con ácido valproico o fenobarbital tuvo ligeramente mejor efecto que la combinación con levetiracetam o lamotrigina. Según Winter et al., (2023), el levetiracetam y en menor medida la lamotrigina, se asocian con una mayor tasa de respuesta a la VNS que el ácido valproico y el fenobarbital en la clínica, lo que no coincide con nuestros resultados en hámster. De acuerdo con estos investigadores, el levetiracetam y la VNS presentan un efecto de desincronización del EEG similar, y podrían estar funcionando de forma sinérgica ampliando esta respuesta. En el caso de los inhibidores de canales de sodio como la lamotrigina, se postula que la VNS, al permitir reducir la dosis de FAE, disminuye los efectos secundarios asociados. Las diferencias obtenidas entre la combinación de FAE y VNS y los estudios clínicos pueden deberse a las características intrínsecas del modelo y las epilepsias humanas.

Únicamente se han encontrado hipótesis o relaciones directas en la literatura entre el mecanismo de la VNS y los fármacos estudiados, aparte de las ya mencionadas, en el caso del ácido valproico. Destaca un estudio reciente en pez cebra, que afirma que este fármaco produce la activación del sistema nervioso autónomo parasimpático aumentando los niveles de acetilcolina, colina y serotonina, efecto similar al que produce la VNS (Skiba et al., 2023). Incluso se ha especulado que parte de los efectos del ácido valproico en humanos podrían estar mediados a través del nervio vago, gracias a su acción sobre receptores PPAR α hepáticos e intestinales, cuya activación se ha llegado a correlacionar con la eficacia anticonvulsiva del fármaco (Cullingford, 2004). Por lo tanto, el mayor efecto en este caso de la combinación de VNS y VPA podría deberse a un efecto potenciador del VPA de los efectos de la VNS, pero, como se ha comentado, el efecto sobre las crisis es sutil en el GASH/Sal y no ha sido detectado en la clínica. Además, aunque la hipótesis mencionada es interesante, sus mecanismos fundamentales son complejos e incluyen otros considerados de mayor importancia, entre los que destacan el aumento de la neurotransmisión GABAérgica, y la inhibición de canales de calcio y de sodio (Ireland & Jewell, 1990). El fenobarbital, por su parte, actúa sobre receptores GABA_A aumentando las corrientes de iones cloruro o activando directamente el receptor a dosis más elevadas. Además, inhibe la neurotransmisión glutamatérgica (Löscher & Rogawski, 2012). En relación con estos mecanismos, se ha descrito un aumento de la densidad los receptores GABA_A en pacientes tratados con VNS (Marrosu et al., 2003). Luego, la combinación de VNS y FAE que actúan sobre los receptores GABA_A, teóricamente podría aumentar el efecto de cada una de las terapias por separado. Además, en el GASH/Sal, la neurotransmisión GABAérgica está alterada (Bonet-Fernández et al., 2023), lo que explica el efecto anticonvulsivo de los fármacos y tratamientos que actúan sobre ella.

No obstante, además del efecto sobre las crisis, hay que tener en cuenta otros efectos de la combinación de ambos tratamientos. En este sentido, los animales que además de VNS recibieron tratamiento con FAE, mostraron una recuperación del peso inicial de forma más rápida que el grupo tratado sólo con VNS. Por otro lado, la VNS puede alterar el metabolismo de los fármacos por vía intraperitoneal, ya que salvo en el caso del VPA, las concentraciones obtenidas en sangre fueron menores en el grupo tratado con VNS. Es posible que si se utilizan otras vías de administración, este fenómeno no se observara. Además, en el caso del levetiracetam, se redujo la toxicidad mostrada por las alteraciones del perfil hepático. Finalmente, en la prueba de campo abierto, la combinación de VNS y PB se asoció con un aumento de la actividad a nivel general con respecto a ambos tratamientos por separado. En el caso de los grupos tratados con VNS y VPA se observó el efecto contrario, además de un aumento del acicalamiento, lo que es consecuente con la leve sedación observada.

7.6 Mecanismos de acción de la VNS: efecto antiinflamatorio

Se han descrito alteraciones en los niveles de marcadores inflamatorios en sangre, líquido cefalorraquídeo y tejido nervioso en pacientes con epilepsia, y se ha postulado

que estas alteraciones podrían estar implicadas en la fisiopatología de la epilepsia (de Vries et al., 2016; Mazdeh et al., 2018). Sin embargo, los estudios realizados en pacientes con epilepsia tratados con VNS son muy heterogéneos, ya que factores como la etiología de la epilepsia o el tratamiento farmacológico pueden afectar directamente a los niveles de estos marcadores. Entre estos estudios, destaca la investigación de Majoie et al., (2010), en la que se describe una disminución de IL-6 en los niveles de sangre periférica y un aumento en los niveles de la citocina antiinflamatoria IL-10 en respondedores a VNS.

Nuestros resultados muestran el efecto antiinflamatorio de esta terapia sobre el tejido nervioso. Así, se ha observado una reducción en dos de los marcadores inflamatorios más estudiados, IL-1 β y TNF- α . Ambas citocinas participan en mecanismos de epileptogénesis, al promover mecanismos de hiperexcitabilidad y excitotoxicidad neuronal. Por un lado, se cree que la IL-1 β induce convulsiones a través de la regulación al alza de los receptores NMDA (Viviani et al., 2003). Además, la administración intracerebral de IL-1 β exagera las convulsiones en modelos de roedores, y las convulsiones, a su vez, inducen una mayor expresión de esta interleucina (Vezzani et al., 1999). Asimismo, se ha relacionado con la génesis de las convulsiones febriles (Heida et al., 2009), con la inhibición de los mecanismos de plasticidad neuronal (Han et al., 2016) y con la interrupción de la transmisión serotoninérgica (Mazarati et al., 2017). Por otro lado, el TNF- α induce el aumento de los receptores AMPA, estimula la liberación de glutamato por parte de la microglía e induce la endocitosis del receptor GABA (Rana & Musto, 2018). En relación con la VNS, se sabe que la actividad del nervio vago se modifica por la exposición a citocinas proinflamatorias, y en particular a la IL-1 β (Goehler et al., 2000). Según Hosoi et al., (2000), la activación de aferentes vagales produciría un aumento de la expresión de IL-1 β en el cerebro, activando así el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, para finalmente producir un efecto antiinflamatorio sistémico. Esto es una aparente contradicción con los resultados observados. Sin embargo, en el estudio mencionado se practicó una vagotomía, la VNS duró solo 2 horas y se utilizaron diferentes parámetros de estimulación. A diferencia de nuestro trabajo, la medición de los niveles de interleucina se limitó al hipocampo y al hipotálamo, y los animales no mostraron crisis epilépticas de ningún tipo.

En nuestro caso, la reducción de IL-1 β también se observó en la prueba ELISA realizada en diferentes regiones del encéfalo. Además, según nuestros resultados, la presencia o no de carrera salvaje en el último registro de las crisis no parece asociarse con un aumento de los niveles de IL-1 β en los animales tratados con VNS. Dicho de otra forma, las crisis categorizadas como leves no producen un aumento de este marcador en tejido nervioso en los GASH/Sal tratados con VNS.

También, se ha detectado una reducción estadísticamente significativa de la expresión de MCP-1, también conocida como CCL2. MCP-1 es una quimiocina cuya expresión aumenta en tejido cerebral extirpado quirúrgicamente de pacientes con epilepsia

refractaria (Choi et al., 2009; Y. Wu et al., 2008) y en algunos modelos animales de epilepsia (Arisi et al., 2015; Foresti et al., 2009). En modelos animales, se ha demostrado que este aumento está relacionado con el reclutamiento de células inmunitarias y con daño neuronal (Manley et al., 2007; Varvel et al., 2016).

En este estudio, observamos una disminución en los niveles de las metaloproteinasas de matriz extracelular MMP-2 y MMP-3. La evidencia experimental sugiere que las MMP están involucradas en la muerte celular inducida por convulsiones, la ruptura de la barrera hematoencefálica, la neuroinflamación y la plasticidad sináptica aberrante, procesos que ocurren en la epileptogénesis (Ikonomidou, 2014). Los niveles de MMP aumentan en el cerebro de pacientes epilépticos y en modelos animales de epilepsia (Korotkov et al., 2018; Rempe et al., 2018). La MMP más estudiada en epilepsia es MMP-9 (Bronisz & Kurkowska-Jastrzębska, 2016). Sería interesante medir sus niveles en GASH/Sal tratados con VNS. No formaba parte de la matriz de marcadores estudiados, pero se evaluará su expresión en próximos estudios. Postulamos que su expresión estaría igualmente reducida. Aunque no se han encontrado estudios que hayan evaluado las MMP en modelos de VNS en epilepsia, la VNS no invasiva reduce los niveles de MMP en el cerebro en modelos de accidente cerebrovascular en roedores (Yang et al., 2018). Por lo tanto, nuestros resultados respaldan la literatura disponible.

Sin embargo, no se pudo detectar un efecto antiinflamatorio estadísticamente significativo en plasma. Esto puede deberse a razones derivadas de nuestro diseño experimental y no implica necesariamente que la VNS no tenga efectos antiinflamatorios similares a nivel sistémico en el GASH/Sal. En primer lugar, las convulsiones afectan al sistema nervioso, y, en segundo lugar, la polaridad de la VNS implica una mayor activación de las aferencias vagales. Por lo tanto, parece lógico que el mayor efecto antiinflamatorio se observe en el tejido cerebral. En segundo lugar, la vida media de algunos de estos marcadores en sangre es de unos pocos minutos (C. Liu et al., 2021), y tal vez haya cambios en algunas de estas moléculas en sangre en períodos de tiempo más cortos después de la inducción de las crisis, pero después de sesenta minutos, estos niveles pueden haberse normalizado a las condiciones iniciales. También, es posible que se requiera una agresión de mayor magnitud que una crisis convulsiva, para observar efectos antiinflamatorios en sangre. Finalmente, los parámetros de estimulación utilizados también podrían tener impacto en el efecto antiinflamatorio sistémico, ya que para el tratamiento de enfermedades inflamatorias se suele aplicar una frecuencia menor de 10Hz (Bonaz et al., 2017; Koopman et al., 2016).

De los resultados obtenidos para alguno de los marcadores en sangre, pese a no haberse detectado diferencias estadísticamente significativas, cabe resaltar los valores de MIP-1 α , también llamada CCL3, que fueron mayores en los animales tratados con VNS ($p = 0.06$). MIP-1 α se trata de una quimiocina asociada al reclutamiento de macrófagos y linfocitos T citotóxicos en procesos inflamatorios (Bhavsar et al., 2015). En relación con la epilepsia, su receptor CCR5 se encuentra sobreexpresado en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal mesial y en la vasculatura cerebral en modelos animales.

Se postula que su inhibición tiene efectos beneficiosos antiepilépticos y antiinflamatorios, ya que modula la infiltración de leucocitos a través de la barrera hematoencefálica (Cerri et al., 2017).

Además, intentamos medir la expresión de marcadores inflamatorios en líquido cefalorraquídeo, pero fue descartado debido a las dificultades técnicas para su extracción y a su escaso volumen en el hámster. Asimismo, intentamos aislar células mononucleares en sangre periférica, para estudios de RT-qPCR, pero tampoco fue posible.

7.7 Mecanismos de acción: efecto sobre la actividad neuronal.

La mayoría de las aferencias del nervio vago cervical terminan en el **núcleo del tracto solitario** (NTS) (Neuhuber & Berthoud, 2021), que junto con el área postrema (AP) y el núcleo motor dorsal del vago (DMV), constituyen el complejo vagal dorsal (Holt, 2022).

El NTS participa en la regulación de funciones tan importantes y difere(Travagli & Anselmi, 2016)o, la digestión (Travagli & Anselmi, 2016), y el control respiratorio y cardiovascular (Blessing & Benarroch, 2012). Además del par X, el NTS también recibe información de los pares craneales V, VII y IX (Krahl & Clark, 2012).

La citoarquitectura del NTS ha sido descrita en el hámster (Whitehead, 1988) y es muy similar a la de otros roedores (Gasparini et al., 2020). Este núcleo habitualmente se divide en una zona rostral “gustativa” y en una zona caudal “visceral”, distinguiéndose a veces, una zona intermedia. En cortes coronales, la parte más caudal presenta forma triangular y está situada entre el AP y el DMV. La parte más rostral tiene forma ovalada y se sitúa en una posición más lateral. Destaca que la mayor parte de aferencias vagas proyectan de forma bilateral a la parte caudal del NTS (Kalia & Sullivan, 1982).

Las conexiones de la parte caudal del NTS se reflejan en la **Figura 52**, destacando el locus coeruleus, el núcleo dorsal del rafe y el área parabraquial, zonas en las que también hemos evaluado la expresión de c-Fos.

La mayoría de los trabajos que abordan el papel del NTS en epilepsia, son estudios de neuromodulación. Destaca la observación de que el aumento de la neurotransmisión GABAérgica o disminución de la actividad glutamatérgica en este núcleo reduce las crisis límbicas inducidas químicamente (Walker et al., 1999). Además, se ha descrito cómo la estimulación de este núcleo ralentiza los mecanismos de epileptogénesis en un modelo de kindling amigdalino (Magdaleno-Madrigal et al., 2002, 2010). Por otro lado, destaca un estudio en el que se aplicó estimulación del tronco vagosimpático en rata bajo anestesia y se eliminaron las conexiones del NTS con regiones superiores al realizar un corte en el encéfalo rostral a esta estructura, comprobándose que parte de la

activación del NTS por el nervio vago tiene lugar a través de proyecciones descendentes de otras áreas cerebrales que amplifican esta activación inicial (Cooper et al., 2021).

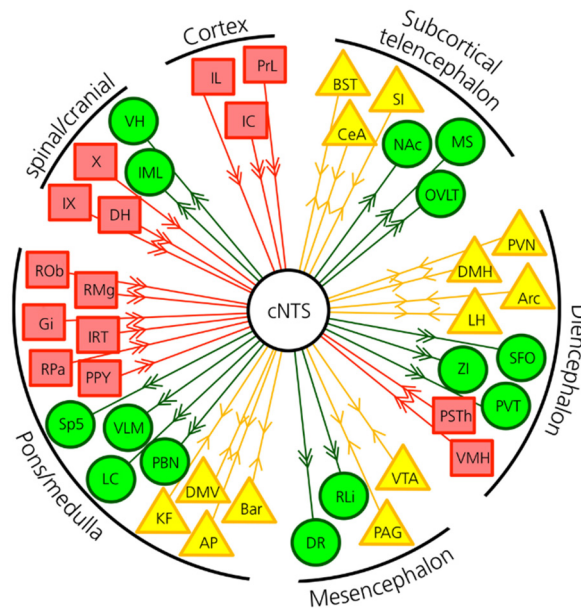


Figura 52. Conexiones de la porción caudal del núcleo del tracto solitario (cNTS). En rojo, aferencias y en verde, eferencias del NTS. En amarillo, conexiones bidireccionales con otras áreas. AP: Área postrema; Arc: núcleo arcuato; Bar: núcleo de Barrington; BST: núcleo del lecho de la estría terminal; CeA: amígdala central; DH: asta dorsal de la médula espinal; DMH: hipotálamo dorsomedial; DMV: núcleo motor dorsal del vago; DR: núcleo dorsal del rafe; Gi: núcleo gigantocelular; IC: corteza insular; IL: corteza infralímbico; IML: columna intermedialateral de la médula espinal; IRT: formación reticular intermedia; IX: Nervio glosofaríngeo; KF: núcleo de Kölliker-Fuse; LC : Locus coeruleus; LH: hipotálamo lateral; MS: septum medial; NAc: núcleo accumbens; OVLT: órgano vascular de la lámina terminal; PAG: sustancia gris periacueductal; PBN: núcleo parabraquial; PrL: corteza prelímbico; PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo; PVT: núcleo paraventricular del tálamo; RLi: núcleo lineal del rafe; RMg: rafe magno; Rob: rafe oscuro; RPa: rafe pálido; SFO: órgano subfornical; SI: sustancia innominada; Sp5: núcleo espinal del trigémino; VH: asta dorsal de la médula espinal; VLM: bulbo ventrolateral; VMH: hipotálamo ventromedial; VTA: área tegmental ventral; X: Nervio Vago; ZI: Zona incerta (Holt, 2022).

En nuestro estudio, se ha observado un aumento bilateral de la expresión de cFos en los animales tratados con VNS en la porción caudal del NTS, lo que es consistente con la distribución anatómica de las terminaciones de las fibras vagales. En la literatura, son varios los estudios que han evaluado la activación de c-Fos por medio de la VNS en el NTS. Los estudios tanto agudos como crónicos han mostrado efectos similares a los que hemos observado en nuestro caso, aun existiendo diferencias en los parámetros de estimulación o en los niveles basales de la expresión de c-Fos en esta estructura, que en el hámster GASH/Sal han sido mayores que en otros modelos (Cunningham et al., 2007; Katagiri et al., 2019; Naritoku et al., 1995; Osharina et al., 2006). En un trabajo en el que se utilizó VNS auricular transcutánea en ratón, no se detectó un aumento en la expresión de c-Fos (Brambilla-Pisoni et al., 2022).

En nuestro trabajo, hemos observado también cómo las crisis parecen aumentar la actividad de este núcleo. Sin embargo, no hemos encontrado estudios en la literatura que hayan relacionado crisis convulsivas con una mayor actividad del NTS. Dada la compleja red de conexiones de este núcleo y las funciones en las que participa, no parece descabellado que se produzcan alteraciones en su actividad como consecuencia de las crisis convulsivas. Con todo, en los animales tratados con VNS, el aumento de la expresión de c-Fos asociado a la estimulación acústica y a las crisis asociadas con un cSI =3, es leve (carrera salvaje y estupor, sin convulsiones tónico-clónicas).

El **locus coeruleus** (LC) es la principal fuente de noradrenalina para el neocórtex, hipocampo, amígdala, tálamo, cerebelo y médula espinal. Las neuronas del LC pueden disparar de forma fásica o tónica y el cambio entre estos estados se relaciona con procesos como la atención, el estrés, el estado sueño-vigilia y la memoria (Benarroch, 2017; Schwarz & Luo, 2015). Además, se postula como un de las áreas clave en el mecanismo de acción de la VNS, ya que su lesión inhibe el efecto anticonvulsivo de la terapia en modelos de roedores (Krahl et al., 1998). Anatómicamente, la comunicación directa entre el NTS y el LC se establece mediante dos rutas disinápticas: una excitatoria (via el núcleo paragigantocelular) y otra inhibitoria (via el núcleo prepósito hipoglosa). De igual modo, existe una proyección monosináptica entre NTS y LC con componentes excitatorios e inhibitorios (Berger et al., 2021). Por otro lado, se ha determinado mediante registros electrofisiológicos que la VNS promueve el disparo de las neuronas del LC (Groves et al., 2005). Además, se ha demostrado una correlación entre los niveles de noradrenalina hipocámpal y el efecto anticonvulsivo de la VNS en modelos de crisis límbicas (Raedt et al., 2011). En diferentes estudios, llevados a cabo desde hace décadas, la activación del LC produce efectos anticonvulsivos, mientras que su lesión, provoca efectos proconvulsivos (Fornai et al., 2011; Giorgi et al., 2004; Oishi & Suenaga, 1982), también en modelos de epilepsia audiógena (Jerlicz et al., 1978).

En nuestro caso, las crisis convulsivas se asocian a un aumento de la expresión de c-Fos en el LC de forma muy clara, efecto que ya ha sido observado en modelos animales, incluyendo algunos de epilepsia audiógena (Eells et al., 2004). Sin embargo, en otros modelos, no se observan estas alteraciones en LC mediante la inducción de crisis (Ohno et al., 2009).

En nuestro trabajo, en el grupo tratado con VNS, 3 horas después de la evaluación de las crisis, el número de células marcadas fue menor que en el grupo sin tratamiento, pero sometido a EA. Postulamos que este hecho se debe a una menor severidad de las crisis (cSI = 3) que en el grupo control (cSI = 8). Sin embargo, 72 horas después de la EA, no se observaron diferencias evidentes entre el grupo no tratado y el tratado con VNS. Hay que tener en cuenta que los GASH/Sal del grupo tratado con VNS no mostraron ningún tipo de conducta ictal en el último registro de las crisis (cSI = 0). En la bibliografía, los estudios apuntan a que la VNS produce una activación de este núcleo (Brougher et al., 2021; Cunningham et al., 2007; Katagiri et al., 2019; Naritoku et al., 1995). Lo que parece claro, es que, de existir un efecto de la VNS en el LC del GASH/Sal, es mucho más sutil que el que producen las crisis.

El **núcleo dorsal del rafe** (DR) es el mayor núcleo serotoninérgico del cerebro y se encuentra interconectado anatómicamente con el LC (Kim et al., 2004). Es por ello, que, teniendo en cuenta el rol de la serotonina en la epilepsia (Theodore, 2003), se ha especulado que la conexión entre estos núcleos juega un papel importante en el efecto anticonvulsivo de la VNS. En este contexto, se ha demostrado que la depleción de serotonina disminuye el umbral de las crisis audiógenas de las ratas GPERs, mientras que compuestos que incrementan sus niveles son anticonvulsivos (Bagdy et al., 2007). También se ha observado que, mientras que el LC muestra una activación a corto (1h) y a largo plazo (90 días) como consecuencia del tratamiento con VNS, la actividad del DR sólo aumenta en estudios a largo plazo (a partir de 14 días) (Dorr & Debonnel, 2006). Asimismo, la activación del LC y el DR están relacionadas, ya que cuando se lesiona el LC, no se observa la activación del DR por la VNS (Manta et al., 2009). Sin embargo, la actividad del DR también es clave en el efecto anticonvulsivo de la VNS. En un modelo de PTZ en rata, el efecto anticonvulsivo de la terapia se eliminó con la destrucción de las neuronas serotoninérgicas (Krahl & Clark, 2012).

En nuestro caso, sí que hemos observado un ligero aumento de la expresión de c-Fos en el grupo tratado 72 horas después de la EA. La activación a largo plazo del DR podría ser la razón por la que, en algunos estudios, la VNS no aumenta la expresión de c-Fos pero sí la de Δ FosB en el DR (Cunningham et al., 2007). Aunque no existen muchos estudios que hayan evaluado el efecto de las crisis en la expresión de c-Fos en el DR, se ha descrito un aumento de la expresión de este marcador durante las crisis hipocampales y se ha demostrado que la inhibición de esta hiperactividad mediante DBS tiene efecto anticonvulsivo (Cheng et al., 2021). En el GASH/Sal, hemos observado este aumento de la activación en el DR durante las crisis y postulamos que la VNS esté modulando la actividad en este área.

Finalmente, estudiamos el **núcleo parabraquial** (PBN), que rodea al pedúnculo cerebeloso superior y habitualmente se subdivide en el núcleo parabraquial medial (MPB), el núcleo parabraquial lateral (LPB) y el núcleo de Kölliker-Fuse (KF). Se trata de un núcleo que participa en funciones cardiovasculares y respiratorias, termorregulación, apetito y la ingesta de sodio, nocicepción y mantenimiento del estado de alerta. En roedores, es un componente de la vía gustativa, aunque en humanos no se ha demostrado. Los inputs del PBN son el NTS, la lámina I del asta dorsal de la médula espinal, la porción caudal del núcleo espinal del trigémino y el AP (Benarroch, 2016). En relación con el NTS, diferentes poblaciones neuronales del NTS proyectan a diferentes regiones del PBN, de manera que la zona rostral del NTS envía más axones hacia el MPB y la zona caudal envía más proyecciones hacia el LPB y el KF (Herbert et al., 1990). Por un lado, los axones que parten del PBN se dirigen hacia núcleos talámicos, hipotalámicos y amigdalinos. Por otro lado, el PBN recibe proyecciones descendentes del córtex cingulado, prefrontal e insular, hipotálamo, núcleo central de la amígdala, y el núcleo del lecho de la estría terminal. Igualmente, el LPB y el KF también envían proyecciones descendentes hacia la formación reticular y el NTS (Geerling et al., 2017). Asimismo, recientemente se ha descrito cómo las células de

Purkinje (PCs) proyectan al PBN permitiendo la modulación de la actividad del cerebro anterior por parte del cerebelo (Chen et al., 2021).

En relación con el mecanismo de acción de la VNS, se ha especulado sobre la importancia de la conexión del PBN con la sustancia innominada y la zona incerta, cuya estimulación es proconvulsiva, mientras que su inhibición podría ser anticonvulsiva (Binnie, 2000). En estudios de fMRI, se ha demostrado que la VNS produce la activación de áreas conectadas con el PBN: lóbulo frontal, ínsula y córtex cingulado (Liu et al., 2003). Además, el PBN participa en la regulación de circuitos tálamocorticales que podrían estar implicados en la generación de las crisis (Hachem et al., 2018).

En este trabajo, hemos observado un aumento de la expresión de c-Fos en los animales tratados con VNS, en el PBN. Las crisis convulsivas se asocian con un aumento de c-Fos en este área, pero los datos indican que el efecto es incluso mayor en los animales tratados con VNS. Nuestros resultados son compatibles con lo que se ha descrito en la bibliografía, ya que, por un lado, otros investigadores también han recogido un aumento de la expresión de c-Fos en el PBN en animales tratados con VNS de forma aguda y crónica (Cunningham et al., 2007), pese a que, en otros trabajos, se obvia este área (Katagiri et al., 2019; Naritoku et al., 1995). Igualmente, en ratas GEPR se ha descrito un aumento de la expresión de c-Fos en el subnúcleo superior lateral de este área tras crisis tónicas generalizadas (Eells et al., 1998). En un modelo de crisis inducidas químicamente con carbacol también se describió un aumento de la expresión de c-Fos en el LPB (Mraovitch & Calando, 1999).

Finalmente, destaca que el foco epileptógeno del GASH/Sal es el colículo inferior (Muñoz et al., 2017), un área cerebral que se encuentra conectada con el LC, el DR (Klepper & Herbert, 1991) y el PBN (Coleman & Clerici, 1987). Por lo tanto, aunque se trata de una hipótesis por demostrar, los cambios en la actividad producidos por la VNS en los núcleos descritos podrían afectar indirectamente a la propia actividad del colículo inferior, al igual que es probable que las crisis convulsivas produzcan cambios a su vez en la actividad de estas zonas en el GASH/Sal por una actividad aberrante del colículo inferior. Es muy interesante cómo en ocasiones puntuales la manipulación por parte de los investigadores puede inducir las crisis convulsivas en el GASH/Sal, y no únicamente como consecuencia de la estimulación auditiva. Aunque tampoco existe evidencia científica, dado el papel de estas áreas, sobre todo del LC, en la regulación del estrés, quizá su activación excesiva ante situaciones de peligro para el animal podría indirectamente activar el foco epileptógeno y desencadenar las crisis convulsivas en ocasiones puntuales.

8 **Conclusiones**

- PRIMERA: La estimulación del nervio vago es un procedimiento seguro en el hámster GASH/Sal, que no ha mostrado efectos secundarios graves ni aplicado sobre el nervio vago izquierdo, ni sobre el derecho, ni en combinación con fármacos antiepilépticos. Su estimulación, con los parámetros seleccionados, no provoca alteraciones morfológicas ni funcionales.
- SEGUNDA: Los parámetros de estimulación vagal seleccionados reducen la frecuencia y severidad de las crisis convulsivas en el hámster GASH/Sal. El efecto anticonvulsivo es progresivo, de manera que la inhibición máxima de las convulsiones tónico-clónicas se produce a los 14 días de tratamiento.
- TERCERA: Se ha desarrollado un sistema de VNS de menor tamaño y más sencillo que el sistema clínico, adecuado para animales pequeños de laboratorio, cuya implantación muestra un efecto anticonvulsivo similar, y permitirá profundizar en el estudio de los mecanismos de acción de la terapia en condiciones similares a la clínica.
- CUARTA: La estimulación del nervio vago derecho con los parámetros seleccionados presenta un efecto anticonvulsivo ligeramente inferior al de la VNS izquierda en el GASH/Sal, sin efectos secundarios.
- QUINTA: No se observó un efecto sinérgico anticonvulsivo claro mediante el uso combinado de VNS y FAE, ya que la reducción en la severidad y frecuencia de las crisis fue similar al más eficaz de ambos tratamientos por separado. El tratamiento combinado de VNS con ácido valproico o fenobarbital produjo mejores efectos que la combinación con lamotrigina o levetiracetam. La VNS modificó ligeramente el metabolismo y absorción de los fármacos.
- SEXTA: La estimulación del nervio vago produce un efecto antiinflamatorio en el tejido nervioso del hámster GASH/Sal, provocando una reducción de los niveles de IL-1 β , TNF- α , MCP-1, MMP-2 y MMP-3. Este efecto no ha sido detectado a nivel sistémico.
- SÉPTIMA: La estimulación del nervio vago modula, de forma bilateral, la actividad neuronal en el núcleo del tracto solitario, locus coeruleus, núcleo dorsal del rafe y núcleo parabraquial del GASH/Sal, áreas cerebrales cuya actividad se ve modificada por las crisis convulsivas en el GASH/Sal.

9 Bibliografía

- Aalbers, M., Vles, J., Klinkenberg, S., Hoogland, G., Majoie, M., & Rijkers, K. (2011). Animal models for vagus nerve stimulation in epilepsy. *Experimental Neurology*, 230(2), 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.04.014>
- Afra, P., Adamolekun, B., Aydemir, S., & Watson, G. D. R. (2021). Evolution of the Vagus Nerve Stimulation (VNS) Therapy System Technology for Drug-Resistant Epilepsy. *Frontiers in Medical Technology*, 3(August). <https://doi.org/10.3389/fmedt.2021.696543>
- Agnew, W. F., & McCreery, D. B. (1990). Considerations for Safety with Chronically Implanted Nerve Electrodes. *Epilepsia*, 31. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1990.tb05845.x>
- Alexander, G. M., Huang, Y. Z., Soderblom, E. J., He, X. P., Moseley, M. A., & McNamara, J. O. (2017). Vagal nerve stimulation modifies neuronal activity and the proteome of excitatory synapses of amygdala/piriform cortex. *Journal of Neurochemistry*, 140(4), 629–644. <https://doi.org/10.1111/jnc.13931>
- Alexander, G. M., & McNamara, J. O. (2012). Vagus nerve stimulation elevates seizure threshold in the kindling model. *Epilepsia*, 53(11). <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03646.x>
- Alves, S. S., da Silva Junior, R. M. P., Delfino-Pereira, P., Pereira, M. G. A. G., Vasconcelos, I., Schwaemmle, H., Mazzei, R. F., Carlos, M. L., Espreafico, E. M., Tedesco, A. C., Sebollela, A., Almeida, S. S., de Oliveira, J. A. C., & Garcia-Cairasco, N. (2022). A Genetic Model of Epilepsy with a Partial Alzheimer's Disease-Like Phenotype and Central Insulin Resistance. *Molecular Neurobiology*, 59(6), 3721–3737. <https://doi.org/10.1007/S12035-022-02810-W>
- Aparicio, L., Fierro, L., Abreu, A., Cárdenas, T., Durán, R., Denes, M., Current, al, Yasbeth Lara Aparicio, S., de Jesús Laureani Fierro, Á., Emiliano Aranda Abreu, G., Toledo Cárdenas, R., Isauro García Hernández, L., Alfonso Coria Ávila, G., Rojas Durán, F., Elena Hernández Aguilar, M., Manzo Denes, J., Donají Chi-Castañeda, L., & Antonio Pérez Estudillo, C. (2022). Current Opinion on the Use of c-Fos in Neuroscience. *NeuroSci 2022, Vol. 3, Pages 687-702*, 3(4), 687–702. <https://doi.org/10.3390/NEUROSCI3040050>
- Arcand, J., Waterhouse, K., Hernandez-Ronquillo, L., Vitali, A., & Tellez-Zenteno, J. F. (2017). Efficacy of Vagal Nerve Stimulation for Drug-Resistant Epilepsy: Is it the Stimulation or Medication? *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 44(5), 532–537. <https://doi.org/10.1017/CJN.2017.46>
- Ardell, J. L., & Randall, W. C. (1986). Selective vagal innervation of sinoatrial and atrioventricular nodes in canine heart. *The American Journal of Physiology*, 251(4 Pt 2). <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.1986.251.4.H764>
- Arisi, G. M., Foresti, M. L., Katki, K., & Shapiro, L. A. (2015). Increased CCL2, CCL3, CCL5, and IL-1 β cytokine concentration in piriform cortex, hippocampus, and neocortex after pilocarpine-induced seizures. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/S12974-015-0347-Z>
- Attenello, F., Amar, A. P., Liu, C., & Apuzzo, M. L. J. (2015). Theoretical Basis of Vagus Nerve Stimulation. *Progress in Neurological Surgery*, 29, 20–28. <https://doi.org/10.1159/000434652>
- Badran, B. W., Huffman, S. M., Dancy, M., Austelle, C. W., Bikson, M., Kautz, S. A., & George, M. S. (2022). A pilot randomized controlled trial of supervised, at-home, self-administered transcutaneous auricular vagus nerve stimulation (taVNS) to manage long COVID symptoms. *Bioelectronic Medicine*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s42234-022-00094-y>
- Bagdy, G., Kecskemeti, V., Riba, P., & Jakus, R. (2007). Serotonin and epilepsy. *Journal of Neurochemistry*, 100(4), 857–873. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2006.04277.X>
- Bailey, P., & Bremer, F. A. (1938). Sensory cortical representation of the vagus nerve: with a note on the effects of low blood pressure on the cortical electrogram. *Journal of Neurophysiology* 1(5) 405-412. <https://doi.org/10.1152/jn.1938.1.5.405>
- Barone, P., Morelli, M., Cicarelli, G., Cozzolino, A., DeJoanna, G., Campanella, G., & DiChiara, G. (1993). Expression of c-fos protein in the experimental epilepsy induced by pilocarpine. *Synapse (New York, N.Y.)*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/SYN.890140102>
- Barrera-Bailón, B., Oliveira, J. A. C., López, D. E., Muñoz, L. J., Garcia-Cairasco, N., & Sancho, C. (2013). Pharmacological and neuroethological studies of three antiepileptic drugs in the Genetic Audiogenic Seizure Hamster (GASH: Sal). *Epilepsy and Behavior*, 28(3), 413–425. <https://doi.org/10.1016/J.YEBEH.2013.05.028>
- Barrera-Bailón, B., Oliveira, J. A. C., López, D. E., Muñoz, L. J., Garcia-Cairasco, N., & Sancho, C. (2017). Pharmacological and neuroethological study of the acute and chronic effects of lamotrigine in the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal). *Epilepsy and Behavior*, 71, 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.yebbeh.2015.11.005>

- Bauer, S., Baier, H., Baumgartner, C., Bohlmann, K., Fauser, S., Graf, W., Hillenbrand, B., Hirsch, M., Last, C., Lerche, H., Mayer, T., Schulze-Bonhage, A., Steinhoff, B. J., Weber, Y., Hartlep, A., Rosenow, F., & Hamer, H. M. (2016). Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation (tVNS) for Treatment of Drug-Resistant Epilepsy: A Randomized, Double-Blind Clinical Trial (cMPsE02). *Brain Stimulation*, 9(3), 356–363. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2015.11.003>
- Becker, A. J. (2018). Review: Animal models of acquired epilepsy: insights into mechanisms of human epileptogenesis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 44(1), 112–129. <https://doi.org/10.1111/NAN.12451>
- Beghi, E., Giussani, G., Abd-Allah, F., Abdela, J., Abdelalim, A., Abraha, H. N., Adib, M. G., Agrawal, S., Alahdab, F., Awasthi, A., Ayele, Y., Barboza, M. A., Belachew, A. B., Biadgo, B., Bijani, A., Bitew, H., Carvalho, F., Chaiah, Y., Daryani, A., ... Murray, C. J. L. (2019). Global, regional, and national burden of epilepsy, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 18(4), 357–375. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30454-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30454-X)
- Benarroch, E. E. (2016). Parabrachial nuclear complex. *Neurology*, 86(7), 676–683. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002393>
- Benarroch, E. E. (2017). Locus coeruleus. *Cell and Tissue Research* 2017 373:1, 373(1), 221–232. <https://doi.org/10.1007/S00441-017-2649-1>
- Ben-Menachem, E., Revesz, D., Simon, B. J., & Silberstein, S. (2015). Surgically implanted and non-invasive vagus nerve stimulation: a review of efficacy, safety and tolerability. *European Journal of Neurology*, 22(9), 1260. <https://doi.org/10.1111/ENE.12629>
- Berger, A., Vespa, S., Dricot, L., Dumoulin, M., Iachim, E., Doguet, P., Vandewalle, G., & El Tahry, R. (2021). How Is the Norepinephrine System Involved in the Antiepileptic Effects of Vagus Nerve Stimulation? *Frontiers in Neuroscience*, 15, 790943. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2021.790943/BIBTEX>
- Bhavsar, I., Miller, C. S., & Al-Sabbagh, M. (2015). Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha (MIP-1 alpha)/CCL3: As a biomarker. In *General Methods in Biomarker Research and their Applications* (Vols. 1–2, pp. 223–249). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7696-8_27
- Biggio, F., Gorini, G., Utzeri, C., Olla, P., Marrosu, F., Mochetti, I., & Follesa, P. (2009). Chronic vagus nerve stimulation induces neuronal plasticity in the rat hippocampus. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 12(9), 1209–1221. <https://doi.org/10.1017/S1461145709000200>
- Binnie, C. D. (2000). Vagus nerve stimulation for epilepsy: A review. *Seizure*, 9(3), 161–169. <https://doi.org/10.1053/SEIZ.1999.0354>
- Blessing, W. W., & Benarroch, E. E. (2012). Lower Brainstem Regulation of Visceral, Cardiovascular, and Respiratory Function. *The Human Nervous System, Third Edition*, 1058–1073. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374236-0.10029-X>
- Bodin, C., Aubert, S., Daquin, G., Carron, R., Scavarda, D., McGonigal, A., & Bartolomei, F. (2015). Responders to vagus nerve stimulation (VNS) in refractory epilepsy have reduced interictal cortical synchronicity on scalp EEG. *Epilepsy Research*, 113. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2015.03.018>
- Bonaz, B., Sinniger, V., & Pellissier, S. (2016). Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation. In *Journal of Physiology* (Vol. 594, Issue 20). <https://doi.org/10.1113/JP271539>
- Bonaz, B., Sinniger, V., & Pellissier, S. (2017). Vagus nerve stimulation: a new promising therapeutic tool in inflammatory bowel disease. *Journal of Internal Medicine*, 282(1), 46–63. <https://doi.org/10.1111/JOIM.12611>
- Bonet-Fernández, J.-M., Tranque, P., Aroca-Aguilar, J. D., Muñoz, L. J., López, D. E., Escribano, J., & de Cabo, C. (2023). Seizures regulate the cation-Cl⁻ cotransporter NKCC1 in a hamster model of epilepsy: implications for GABA neurotransmission. *Frontiers in Neurology*, 14, 1207616. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1207616>
- Boon, P., Moors, I., De Herdt, V., & Vonck, K. (2006). Vagus nerve stimulation and cognition. *Seizure*, 15(4). <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2006.02.014>
- Bottomley, J. M., LeReun, C., Diamantopoulos, A., Mitchell, S., & Gaynes, B. N. (2020). Vagus nerve stimulation (VNS) therapy in patients with treatment resistant depression: A systematic review and meta-analysis. In *Comprehensive Psychiatry* (Vol. 98). <https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2019.152156>
- Brambilla-Pisoni, C., Muñoz-Moreno, E., Gallego-Amaro, I., Maldonado, R., Ivorra, A., Soria, G., & Ozaita, A. (2022). Auricular Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation Acutely Modulates Brain Connectivity in Mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2022.856855>

- Brodie, M. J., Barry, S. J. E., Bamagous, G. A., Norrie, J. D., & Kwan, P. (2012). Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy. *Neurology*, 78(20), 1548–1554. <https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E3182563B19>
- Bronisz, E., & Kurkowska-Jastrzębska, I. (2016). Matrix Metalloproteinase 9 in Epilepsy: The Role of Neuroinflammation in Seizure Development. *Mediators of Inflammation*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7369020>
- Brougher, J., Aziz, U., Adari, N., Chaturvedi, M., Jules, A., Shah, I., Syed, S., & Thorn, C. A. (2021). Self-Administration of Right Vagus Nerve Stimulation Activates Midbrain Dopaminergic Nuclei. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 782786. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2021.782786/BIBTEX>
- Browning, R. A. (1986). VII. Neuroanatomical localization of structures responsible for seizures in the GEPR: Lesion studies. *Life Sciences*, 39(10), 857–867. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(86\)90367-X](https://doi.org/10.1016/0024-3205(86)90367-X)
- Bunch, S., DeGiorgio, C. M., Krahl, S., Britton, J., Green, P., Lancman, M., Murphy, J., Olejniczak, P., Shih, J., & Heck, C. N. (2007). Vagus nerve stimulation for epilepsy: Is output current correlated with acute response? *Acta Neurologica Scandinavica*, 116(4). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2007.00878.x>
- Cabral-Pereira, G., Sánchez-Benito, D., Díaz-Rodríguez, S. M., Gonçalves, J., Sancho, C., Castellano, O., Muñoz, L. J., López, D. E., & Gómez-Nieto, R. (2021). Behavioral and Molecular Effects Induced by Cannabidiol and Valproate Administration in the GASH/Sal Model of Acute Audiogenic Seizures. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.612624>
- Canal-Alonso, Á., Casado-Vara, R., Castellano, O., Herrera-Santos, J., Gonçalves, J., Márquez-Sánchez, S., Gonçalves, J. M., & Corchado, J. M. (2022). An affordable implantable vagus nerve stimulator system for use in animal research. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 380(2228). <https://doi.org/10.1098/rsta.2021.0010>
- Capilupi, M. J., Kerath, S. M., & Becker, L. B. (2020). Vagus nerve stimulation and the cardiovascular system. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(2), 1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034173>
- Carballosa-Gonzalez, M. M., Muñoz, L. J., López-Alburquerque, T., Pardal-Fernández, J. M., Nava, E., de Cabo, C., Sancho, C., & López, D. E. (2013). EEG characterization of audiogenic seizures in the hamster strain GASH: Sal. *Epilepsy Research*, 106(3), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2013.07.001>
- Cela, E., McFarlan, A. R., Chung, A. J., Wang, T., Chierzi, S., Murai, K. K., & Sjöström, P. J. (2019). An Optogenetic Kindling Model of Neocortical Epilepsy. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-41533-2>
- Cerri, C., Calco, M., & Bozzi, Y. (2017). Chemokines as new inflammatory players in the pathogenesis of epilepsy. *Epilepsy Research*, 136, 77–83. <https://doi.org/10.1016/J.EPLEPSYRES.2017.07.016>
- Chakraborty, A., & Rutka, J. T. (2010). Surgical approaches for epilepsy. *Therapy*, 7(5), 467–479.
- Chang, C. W., Lee, S. T., Lim, S. N., Cheng, M. Y., Lee, C. Y., & Wu, T. (2019). Electrical cortical stimulation for refractory focal epilepsy: A long-term follow-up study. *Epilepsy Research*, 151, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2019.01.003>
- Chang, Y. C., Cracchiolo, M., Ahmed, U., Mughrabi, I., Gabalski, A., Daytz, A., Rieth, L., Becker, L., Datta-Chaudhuri, T., Al-Abed, Y., Zanos, T. P., & Zanos, S. (2020). Quantitative estimation of nerve fiber engagement by vagus nerve stimulation using physiological markers. *Brain Stimulation*, 13(6). <https://doi.org/10.1016/j.brs.2020.09.002>
- Chen, C. H., Newman, L. N., Stark, A. P., Bond, K. E., Zhang, D., Mutume, K., Flaquer, I., & Regehr, W. G. (2021). A Purkinje cell to parabrachial nucleus pathway enables broad cerebellar influence over the forebrain and emotional valence. *BioRxiv*, 2021.09.21.461236. <https://doi.org/10.1101/2021.09.21.461236>
- Chen, Z., Brodie, M. J., Liew, D., & Kwan, P. (2018). Treatment Outcomes in Patients With Newly Diagnosed Epilepsy Treated With Established and New Antiepileptic Drugs: A 30-Year Longitudinal Cohort Study. *JAMA Neurology*, 75(3), 279–286. <https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2017.3949>
- Cheng, H., Qi, Y., Lai, N., Yang, L., Xu, C., Wang, S., Guo, Y., Chen, Z., & Wang, Y. (2021). Inhibition of hyperactivity of the dorsal raphe 5-HTergic neurons ameliorates hippocampal seizure. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 27(8), 963. <https://doi.org/10.1111/CNS.13648>
- Choi, J., Nordli, D. R., Alden, T. D., DiPatri, A., Laux, L., Kelley, K., Rosenow, J., Schuele, S. U., Rajaram, V., & Koh, S. (2009). Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. *Journal of Neuroinflammation*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-6-38/FIGURES/5>

- Coleman, J. R., & Clerici, W. J. (1987). Sources of projections to subdivisions of the inferior colliculus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 262(2), 215–226. <https://doi.org/10.1002/CNE.902620204>
- Conway, C. R., Olin, B., Aaronson, S. T., Sackeim, H. A., Bunker, M., Kriedt, C., Greco, T., Broglio, K., Vestrucci, M., & Rush, A. J. (2020). A prospective, multi-center randomized, controlled, blinded trial of vagus nerve stimulation for difficult to treat depression: A novel design for a novel treatment. *Contemporary Clinical Trials*, 95. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2020.106066>
- Cooper, C. M., Farrand, A. Q., Andresen, M. C., & Beaumont, E. (2021). Vagus nerve stimulation activates nucleus of solitary tract neurons via supramedullary pathways. *Journal of Physiology*, 599(23), 5261–5279. <https://doi.org/10.1113/JP282064>
- Coppola, A., & Moshé, S. L. (2012). Animal models. *Handbook of Clinical Neurology*, 107, 63–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52898-8.00004-5>
- Corrales-Hernández, M. G., Villarroel-Hagemann, S. K., Mendoza-Rodelo, I. E., Palacios-Sánchez, L., Gaviria-Carrillo, M., Buitrago-Ricaurte, N., Espinosa-Lugo, S., Calderon-Ospina, C.-A., & Rodríguez-Quintana, J. H. (2023). Development of Antiepileptic Drugs throughout History: From Serendipity to Artificial Intelligence. *Biomedicines*, 11(6), 1632. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11061632>
- Cruz-Mendoza, F., Jauregui-Huerta, F., Luquin, S., Aguilar-Delgadillo, A., & García-Estrada, J. (2022). Immediate Early Gene c-fos in the Brain: Focus on Glial Cells. *Brain Sciences*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/BRAINSCI12060687>
- Cullingford, T. (2004). The vagus nerve - A common route for epilepsy therapies? *Lancet Neurology*, 3(9), 518. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00850-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00850-6)
- Cunningham, J. T., Mifflin, S. W., Gould, G. G., & Frazer, A. (2007). Induction of c-Fos and ΔFosB Immunoreactivity in Rat Brain by Vagal Nerve Stimulation. *Neuropsychopharmacology* 2008 33:8, 33(8), 1884–1895. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301570>
- Damasceno, S., Gómez-Nieto, R., Garcia-Cairasco, N., Herrero-Turrión, M. J., Marín, F., & López, D. E. (2020). Top Common Differentially Expressed Genes in the Epileptogenic Nucleus of Two Strains of Rodents Susceptible to Audiogenic Seizures: WAR and GASH/Sal. *Frontiers in Neurology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00033>
- Dawson, J., Engineer, N. D., Prudente, C. N., Pierce, D., Francisco, G., Yozbatiran, N., Tarver, W. B., Casavant, R., Kline, D. K., Cramer, S. C., Van de Winckel, A., & Kimberley, T. J. (2020). Vagus Nerve Stimulation Paired With Upper-Limb Rehabilitation After Stroke: One-Year Follow-up. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 34(7). <https://doi.org/10.1177/1545968320924361>
- De Ferrari, G. M., Crijns, H. J. G. M., Borggrefe, M., Milasinovic, G., Smid, J., Zabel, M., Gavazzi, A., Sanzo, A., Dennert, R., Kuschyk, J., Raspopovic, S., Klein, H., Swedberg, K., & Schwartz, P. J. (2011). Chronic vagus nerve stimulation: A new and promising therapeutic approach for chronic heart failure. *European Heart Journal*, 32(7). <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq391>
- De Giorgio, C. M., & Kral, S. E. (2013). Neurostimulation for Drug-Resistant Epilepsy. *Continuum : Lifelong Learning in Neurology*, 19(3 Epilepsy), 743. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000431397.61970.2B>
- De Herdt, V., Puimege, L., De Waele, J., Raedt, R., Wyckhuys, T., El Tahry, R., Libert, C., Wadman, W., Boon, P., & Vonck, K. (2009). Increased rat serum corticosterone suggests immunomodulation by stimulation of the vagal nerve. *Journal of Neuroimmunology*, 212(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.04.013>
- de Vries, E. E., van den Munckhof, B., Braun, K. P. J., van Royen-Kerkhof, A., de Jager, W., & Jansen, F. E. (2016). Inflammatory mediators in human epilepsy: A systematic review and meta-analysis. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 63, pp. 177–190). *Neurosci Biobehav Rev*. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.02.007>
- DeGiorgio, C., Heck, C., Bunch, S., Britton, J., Green, P., Lancman, M., Murphy, J., Olejniczak, P., Shih, J., Arrambide, S., & Soss, J. (2005). Vagus nerve stimulation for epilepsy: Randomized comparison of three stimulation paradigms. *Neurology*, 65(2). <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000168899.11598.00>
- Díaz-Casado, E., Gómez-Nieto, R., De Pereda, J. M., Muñoz, L. J., Jara-Acevedo, M., & López, D. E. (2020). Analysis of gene variants in the GASH/Sal model of epilepsy. *PLoS ONE*, 15(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229953>
- Díaz-Rodríguez, S. M., López-López, D., Herrero-Turrión, M. J., Gómez-Nieto, R., Canal-Alonso, A., & López, D. E. (2020). Inferior Colliculus Transcriptome After Status Epilepticus in the Genetically Audiogenic Seizure-Prone Hamster GASH/Sal. *Frontiers in Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00508>

- Donahue, M. J., Ejneby, M. S., Jakešová, M., Caravaca, A. S., Andersson, G., Sahalianov, I., Derek, V., Hult, H., Olofsson, P. S., & Głowacki, E. D. (2022). Wireless optoelectronic devices for vagus nerve stimulation in mice. *Journal of Neural Engineering*, 19(6). <https://doi.org/10.1088/1741-2552/aca1e3>
- Dorr, A. E., & Debonnel, G. (2006). Effect of vagus nerve stimulation on serotonergic and noradrenergic transmission. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(2), 890–898. <https://doi.org/10.1124/JPET.106.104166>
- Dos Santos, C. C., Shan, Y., Akram, A., Slutsky, A. S., & Haitzma, J. J. (2011). Neuroimmune regulation of ventilator-induced lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(4). <https://doi.org/10.1164/rccm.201002-0314OC>
- Dusi, V., & De Ferrari, G. M. (2021). Vagal stimulation in heart failure. *Herz*, 46(6), 541–549. <https://doi.org/10.1007/s00059-021-05076-5>
- Eells, J. B., Clough, R. W., & Browning, R. A. (1998). Expression of Fos in the superior lateral subdivision of the lateral parabrachial (LPBsl) area after generalized tonic seizures in rats. *Brain Research Bulletin*, 47(2), 155–161. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(98\)00055-0](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(98)00055-0)
- Eells, J. B., Clough, R. W., Browning, R. A., & Jobe, P. C. (2004). Comparative Fos immunoreactivity in the brain after forebrain, brainstem, or combined seizures induced by electroshock, pentylenetetrazol, focally induced and audiogenic seizures in rats. *Neuroscience*, 123(1), 279–292. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.08.015>
- Eggleston, K. S., Olin, B. D., & Fisher, R. S. (2014). Ictal tachycardia: The head-heart connection. In *Seizure* (Vol. 23, Issue 7). <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2014.02.012>
- Elam, M., Augustinsson, L. E., & Ben Menachem, E. (1993). Does Vagal Nerve-Stimulation in Patients with Partial Epilepsy Affect Vagal C-Fibers. *Neurology*, 43(4), A161–A162.
- Engineer, N. D., Riley, J. R., Seale, J. D., Vrana, W. A., Shetake, J. A., Sudanagunta, S. P., Borland, M. S., & Kilgard, M. P. (2011). Reversing pathological neural activity using targeted plasticity. *Nature*, 470(7332). <https://doi.org/10.1038/nature09656>
- Englot, D. J., Chang, E. F., & Auguste, K. I. (2011). Vagus nerve stimulation for epilepsy: A meta-analysis of efficacy and predictors of response - A review. In *Journal of Neurosurgery* (Vol. 115, Issue 6). <https://doi.org/10.3171/2011.7.JNS11977>
- Englot, D. J., Hassnain, K. H., Rolston, J. D., Harward, S. C., Sinha, S. R., & Haglund, M. M. (2017). Quality-of-life metrics with vagus nerve stimulation for epilepsy from provider survey data. *Epilepsy and Behavior*, 66. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.10.005>
- Englot, D. J., Rolston, J. D., Wright, C. W., Hassnain, K. H., & Chang, E. F. (2016). Rates and Predictors of Seizure Freedom with Vagus Nerve Stimulation for Intractable Epilepsy. *Neurosurgery*, 79(3), 345–353. <https://doi.org/10.1227/NEU.0000000000001165>
- Fahoum, F., Boffini, M., Kann, L., Faini, S., Gordon, C., Tzadok, M., & El Tahry, R. (2022). VNS parameters for clinical response in Epilepsy. *Brain Stimulation*, 15(3). <https://doi.org/10.1016/j.brs.2022.05.016>
- Faingold, C. L. (2002). Role of GABA abnormalities in the inferior colliculus pathophysiology – audiogenic seizures. *Hearing Research*, 168(1–2), 223–237. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(02\)00373-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(02)00373-8)
- Falco-Walter, J. (2020). Epilepsy-Definition, Classification, Pathophysiology, and Epidemiology. *Seminars in Neurology*, 40(6), 617–623. <https://doi.org/10.1055/S-0040-1718719>
- Farber, S. (1937). Studies on pulmonary edema i. The consequences of bilateral cervical vagotomy in the rabbit. *Journal of Experimental Medicine*, 66(4), 397–404. <https://doi.org/10.1084/jem.66.4.397>
- Fedotova, I. B., Surina, N. M., Nikolaev, G. M., Revishchin, A. V., & Poletaeva, I. I. (2021). Rodent Brain Pathology, Audiogenic Epilepsy. *Biomedicines*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/BIMEDICINES9111641>
- Fiest, K. M., Sauro, K. M., Wiebe, S., Patten, S. B., Kwon, C. S., Dykeman, J., Pringsheim, T., Lorenzetti, D. L., & Jetté, N. (2017). Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*, 88(3), 296–303. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003509>
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014). ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475–482. <https://doi.org/10.1111/EPI.12550/SUPPINFO>
- Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I. E., & Zuberi, S. M. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE

- Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 522–530. <https://doi.org/10.1111/EPI.13670>
- Fisher, R. S., Van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470–472. <https://doi.org/10.1111/J.0013-9580.2005.66104.X>
- Foresti, M. L., Arisi, G. M., Katki, K., Montañez, A., Sanchez, R. M., & Shapiro, L. A. (2009). Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 are increased in the hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. *Journal of Neuroinflammation*, 6. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-6-40>
- Fornai, F., Ruffoli, R., Giorgi, F. S., & Paparelli, A. (2011). The role of locus coeruleus in the antiepileptic activity induced by vagus nerve stimulation. *European Journal of Neuroscience*, 33(12), 2169–2178. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2011.07707.X>
- Fuerte Hortigón, A., Gonçalves Sánchez, J., Barbado, M.V., de Castro Medeiros, D., Sánchez Benito, D., López, D.E. (25-27 de noviembre de 2018). *FDG-PET en el modelo de epilepsia GASH:Sal* [Póster]. V Congreso de la Sociedad Española de Epilepsia, Málaga, España.
- Fuerte-Hortigón, A., Gonçalves, J., Zeballos, L., Masa, R., Gómez-Nieto, R., & López, D. E. (2021). Distribution of the Cannabinoid Receptor Type 1 in the Brain of the Genetically Audiogenic Seizure-Prone Hamster GASH/Sal. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.613798>
- Furmaga, H., Sadhu, M., & Frazer, A. (2012). Comparison of Δ FosB Immunoreactivity Induced by Vagal Nerve Stimulation with That Caused by Pharmacologically Diverse Antidepressants. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341(2), 317. <https://doi.org/10.1124/JPET.111.188953>
- García-Cairasco, N., Doretto, M., Prado, R., Jorge, B., Terra, V., & Oliveira, J. (1992). New insights into behavioral evaluation of audiogenic seizures. A comparison of two ethological methods. *Behavioural Brain Research*, 48, 49–56.
- García-Cairasco, N., Oliveira, J. A. C., Wakamatsu, H., Bueno, S. T. B., & Guimarães, F. S. (1998). Reduced exploratory activity of audiogenic seizures susceptible Wistar rats. *Physiology and Behavior*, 64(5), 671–674. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00129-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00129-2)
- García-Cairasco, N., Rossetti, F., Oliveira, J. A., & de A. Furtado, M. (2004). Neuroethological study of status epilepticus induced by systemic pilocarpine in Wistar audiogenic rats (WAR strain). *Epilepsy and Behavior*, 5(4), 455–463. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2004.04.005>
- García-Cairasco, N., Wakamatsu, H., Oliveira, J. A. C., Gomes, E. L. T., Del Bel, E. A., & Mello, L. E. A. M. (1996). Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Research*, 26(1), 177–192. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(96\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(96)00050-2)
- García-March, G., Sánchez-Ledesma, M. J., & Broseta, J. (2008). Estimulación eléctrica vagal en el tratamiento de la epilepsia rebelde. Situación actual. *Neurocirugía*, 19(5), 416–426. [https://doi.org/10.1016/s1130-1473\(08\)70208-2](https://doi.org/10.1016/s1130-1473(08)70208-2)
- García-Pallero, M. A., García-Navarrete, E., Torres, C. V., Pastor, J., Navas, M., & Sola, R. G. (2017). Effectiveness of vagal nerve stimulation in medication-resistant epilepsy. Comparison between patients with and without medication changes. *Acta Neurochirurgica*, 159(1), 131–136. <https://doi.org/10.1007/S00701-016-3027-6>
- García-Peral, C., Ledesma, M. M., Herrero-Turrión, M. J., Gómez-Nieto, R., Castellano, O., & López, D. E. (2023). Proteomic and Bioinformatic Tools to Identify Potential Hub Proteins in the Audiogenic Seizure-Prone Hamster GASH/Sal. *Diagnostics*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/diagnostics13061048>
- García-Ramos, R., Pastor, A. G., Masjuan, J., Sánchez, C., & Gil, A. (2011). FEEN: Informe sociosanitario FEEN sobre la epilepsia en España. *Neurología*, 26(9), 548–555. <https://doi.org/10.1016/J.NRL.2011.04.002>
- Gasparini, S., Howland, J. M., Thatcher, A. J., & Geerling, J. C. (2020). Central afferents to the nucleus of the solitary tract in rats and mice. *The Journal of Comparative Neurology*, 528(16), 2708. <https://doi.org/10.1002/CNE.24927>
- Geerling, J. C., Yokota, S., Rukhadze, I., Roe, D., & Chamberlin, N. L. (2017). Kölliker–Fuse GABAergic and glutamatergic neurons project to distinct targets. *The Journal of Comparative Neurology*, 525(8), 1844. <https://doi.org/10.1002/CNE.24164>
- George, M. S., Ward, H. E., Ninan, P. T., Pollack, M., Nahas, Z., Anderson, B., Kose, S., Howland, R. H., Goodman, W. K., & Ballenger, J. C. (2008). A pilot study of vagus nerve stimulation (VNS) for

- treatment-resistant anxiety disorders. *Brain Stimulation*, 1(2).
<https://doi.org/10.1016/j.brs.2008.02.001>
- Giordano, F., Zicca, A., Barba, C., Guerrini, R., & Genitori, L. (2017). Vagus nerve stimulation: Surgical technique of implantation and revision and related morbidity. *Epilepsia*, 58, 85–90.
<https://doi.org/10.1111/epi.13678>
- Giorgi, F. S., Pizzanelli, C., Biagioni, F., Murri, L., & Fornai, F. (2004). The role of norepinephrine in epilepsy: from the bench to the bedside. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(5), 507–524.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2004.06.008>
- Goehler, L. E., Gaykema, R. P. A., Hansen, M. K., Anderson, K., Maier, S. F., & Watkins, L. R. (2000). Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, 85(1–3), 49–59. [https://doi.org/10.1016/S1566-0702\(00\)00219-8](https://doi.org/10.1016/S1566-0702(00)00219-8)
- Gonçalves Estella, J.M., López, D.E., Sancho, C., García-Cenador, B., Gonçalves Sánchez, J., Castellano, O., Sánchez Ledesma, M.J. (2018). El hámster GASH:SAL como modelo experimental de epilepsia en el estudio de la estimulación vagal. *Neurocirugía*, 29 (*Espec Congr*), 41.
- Grioni, D., & Landi, A. (2019). Does Vagal Nerve Stimulation Treat Drug-Resistant Epilepsy in Patients with Tuberous Sclerosis Complex? *World Neurosurgery*, 121, 251–253.
<https://doi.org/10.1016/J.WNEU.2018.10.077>
- Groves, D. A., Bowman, E. M., & Brown, V. J. (2005). Recordings from the rat locus coeruleus during acute vagal nerve stimulation in the anaesthetised rat. *Neuroscience Letters*, 379(3), 174–179.
<https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2004.12.055>
- Hachem, L. D., Wong, S. M., & Ibrahim, G. M. (2018). The vagus afferent network: emerging role in translational connectomics. *Neurosurgical Focus*, 45(3), E2.
<https://doi.org/10.3171/2018.6.FOCUS18216>
- Hajtovic, S., LoPresti, M. A., Zhang, L., Katlowitz, K. A., Kizek, D. J., & Lam, S. (2022). The role of vagus nerve stimulation in genetic etiologies of drug-resistant epilepsy: a meta-analysis. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, 29 (6). <https://doi.org/10.3171/2022.1.PEDS222>
- Hakami, T., & Tahir Hakami, C. (2021). Neuropharmacology of Antiseizure Drugs. *Neuropsychopharmacology Reports*, 41(3), 336–351. <https://doi.org/10.1002/NPR2.12196>
- Hakon, J., Moghiseh, M., Poulsen, I., Øland, C. M. L., Hansen, C. P., & Sabers, A. (2020). Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation in Patients With Severe Traumatic Brain Injury: A Feasibility Trial. *Neuromodulation*, 23(6). <https://doi.org/10.1111/ner.13148>
- Hamer, H. M., & Bauer, S. (2019). Lessons learned from transcutaneous vagus nerve stimulation (tVNS). *Epilepsy Research*, 153(February), 83–84. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2019.02.015>
- Hamilton, P., Soryal, I., Dhahri, P., Wimalachandra, W., Leat, A., Hughes, D., Toghil, N., Hodson, J., Sawlani, V., Hayton, T., Samarasekera, S., Bagary, M., McCorry, D., & Chelvarajah, R. (2018). Clinical outcomes of VNS therapy with AspireSR® (including cardiac-based seizure detection) at a large complex epilepsy and surgery centre. *Seizure*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.03.022>
- Han, T., Qin, Y., Mou, C., Wang, M., Jiang, M., & Liu, B. (2016). Seizure induced synaptic plasticity alteration in hippocampus is mediated by IL-1 β receptor through PI3K/Akt pathway. *American Journal of Translational Research*, 8(10), 4499. <https://pmc/articles/PMC5095344/>
- Hasan, A., Wolff-Menzler, C., Pfeiffer, S., Falkai, P., Weidinger, E., Jobst, A., Hoell, I., Malchow, B., Yeganeh-Doost, P., Strube, W., Quast, S., Müller, N., & Wobrock, T. (2015). Transcutaneous noninvasive vagus nerve stimulation (tVNS) in the treatment of schizophrenia: a bicentric randomized controlled pilot study. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 265(7). <https://doi.org/10.1007/s00406-015-0618-9>
- Hassert, D. L., Miyashita, T., & Williams, C. L. (2004). The Effects of Peripheral Vagal Nerve Stimulation at a Memory-Modulating Intensity on Norepinephrine Output in the Basolateral Amygdala. *Behavioral Neuroscience*, 118(1). <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.1.79>
- Heida, J. G., Moshé, S. L., & Pittman, Q. J. (2009). The role of interleukin-1 β in febrile seizures. *Brain & Development*, 31(5), 388. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINDEV.2008.11.013>
- Helmers, S. L., Begnaud, J., Cowley, A., Corwin, H. M., Edwards, J. C., Holder, D. L., Kostov, H., Larsson, P. G., Levisohn, P. M., De Menezes, M. S., Stefan, H., & Labiner, D. M. (2012). Application of a computational model of vagus nerve stimulation. *Acta Neurologica Scandinavica*, 126(5). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2012.01656.x>
- Henry, T. R., Bakay, R. A. E., Pennell, P. B., Epstein, C. M., & Votaw, J. R. (2004). Brain blood-flow alterations induced by therapeutic vagus nerve stimulation in partial epilepsy: II. Prolonged effects at high and low levels of stimulation. *Epilepsia*, 45(9). <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.03104.x>

- Henry, T. R., Votaw, J. R., Pennell, P. B., Epstein, C. M., Bakay, R. A. E., Faber, T. L., Grafton, S. T., & Hoffman, J. M. (1999). Acute blood flow changes and efficacy of vagus nerve stimulation in partial epilepsy. *Neurology*, 52(6). <https://doi.org/10.1212/wnl.52.6.1166>
- Herbert, H., Moga, M. M., & Saper, C. B. (1990). Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 293(4), 540–580. <https://doi.org/10.1002/CNE.902930404>
- Hernández-Noriega, S. (2017). Efecto de las crisis repetitivas en el modelo experimental de epilepsia GASH:Sal [Tesis de doctorado, Universidad de Salamanca]. Repositorio GREDOS. <https://doi.org/10.14201/gredos.136900>
- Herrera, D. G., & Robertson-F, H. A. (1996). Activation of c-Fos in the brain. *Progress in Neurobiology*, 50, 83. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(96\)00021-4](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(96)00021-4)
- Hirtz, D., Thurman, D. J., Gwinn-Hardy, K., Mohamed, M., Chaudhuri, A. R., & Zalutsky, R. (2007). How common are the “common” neurologic disorders? *Neurology*, 68(5), 326–337. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000252807.38124.A3>
- Holt, M. K. (2022). The ins and outs of the caudal nucleus of the solitary tract: An overview of cellular populations and anatomical connections. *Journal of Neuroendocrinology*, 34(6), e13132. <https://doi.org/10.1111/JNE.13132>
- Hosoi, T., Okuma, Y., & Nomura, Y. (2000). Electrical stimulation of afferent vagus nerve induces IL-1beta expression in the brain and activates HPA axis. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279(1). <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.2000.279.1.R141>
- Hull, M. M., Madhavan, D., & Zaroff, C. M. (2015). Autistic spectrum disorder, epilepsy, and vagus nerve stimulation. *Child's Nervous System*, 31(8). <https://doi.org/10.1007/s00381-015-2720-8>
- Hwang, S. S., Takata, M. C., Fujioka, K., & Fuller, W. (2016). Update on bariatric surgical procedures and an introduction to the implantable weight loss device: The Maestro Rechargeable System. *Medical Devices: Evidence and Research*, 9. <https://doi.org/10.2147/MDER.S106223>
- Ikonomidou, C. (2014). Matrix metalloproteinases and epileptogenesis. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/S40348-014-0006-Y>
- Intyre, C. M. (2019). Vagus Nerve Stimulation as a Strategy to Augment PTSD Rehabilitation. *Brain Stimulation*, 12(2). <https://doi.org/10.1016/j.brs.2018.12.357>
- Ireland, A., & Jewell, D. P. (1990). Mechanism of action of 5-aminosalicylic acid and its derivatives. In *Clinical Science* (Vol. 78, Issue 2, pp. 119–125). <https://doi.org/10.1042/cs0780119>
- Iriarte, J., Urrestarazu, E., Alegre, M., Macías, A., Gómez, A., Amaro, P., Artieda, J., & Viteri, C. (2009). Late-onset periodic asystolia during vagus nerve stimulation. *Epilepsia*, 50(4). <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01918.x>
- Jerlicz, M., Kostowski, W., Bidzinski, A., Hauptman, M., & Dymecki, J. (1978). Audiogenic seizures in rats: Relation to noradrenergic neurons of the locus coeruleus. *Acta Physiologica Polonica*, 29(5), 409–412. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/747102/>
- Jette, N., Reid, A. Y., & Wiebe, S. (2014). Surgical management of epilepsy. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, 186(13), 997. <https://doi.org/10.1503/CMAJ.121291>
- Kalia, M., & Sullivan, J. M. (1982). Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 211(3), 248–264. <https://doi.org/10.1002/CNE.902110304>
- Kandratavicius, L., Alves Balista, P., Lopes-Aguiar, C., Ruggiero, R. N., Umeoka, E. H., Garcia-Cairasco, N., Bueno-Junior, L. S., & Leite, J. P. (2014). Animal models of epilepsy: Use and limitations. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 10, 1693–1705. <https://doi.org/10.2147/NDT.S50371>
- Kanner, A. M., Ashman, E., Gloss, D., Harden, C., Bourgeois, B., Bautista, J. F., Abou-Khalil, B., Burakgazi-Dalkilic, E., Park, E. L., Stern, J., Hirtz, D., Nespeca, M., Gidal, B., Faught, E., & French, J. (2018). Practice guideline update summary: Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs I: Treatment of new-onset epilepsy: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. *Neurology*, 91(2), 74–81. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005755>
- Katagiri, M., Iida, K., Ishihara, K., Nair, D., Harada, K., Kagawa, K., Seyama, G., Hashizume, A., Kuramoto, T., Hanaya, R., Arita, K., & Kurisu, K. (2019). Anti-seizure effect and neuronal activity change in the genetic-epileptic model rat with acute and chronic vagus nerve stimulation. *Epilepsy Research*, 155. <https://doi.org/10.1016/J.EPLEPSYRES.2019.106159>

- Keezer, M. R., Sisodiya, S. M., & Sander, J. W. (2016). Comorbidities of epilepsy: Current concepts and future perspectives. *The Lancet Neurology*, 15(1), 106–115. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00225-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00225-2)
- Kim, M. A., Lee, H. S., Lee, B. Y., & Waterhouse, B. D. (2004). Reciprocal connections between subdivisions of the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *Brain Research*, 1026(1), 56–67. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2004.08.022>
- Klepper, A., & Herbert, H. (1991). Distribution and origin of noradrenergic and serotonergic fibers in the cochlear nucleus and inferior colliculus of the rat. *Brain Research*, 557(1–2), 190–201. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90134-H](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90134-H)
- Koopman, F. A., Chavan, S. S., Miljko, S., Grazio, S., Sokolovic, S., Schuurman, P. R., Mehta, A. D., Levine, Y. A., Faltys, M., Zitnik, R., Tracey, K. J., & Tak, P. P. (2016). Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(29), 8284–8289. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1605635113>
- Koopman, F. A., Schuurman, P. R., Vervoordeldonk, M. J., & Tak, P. P. (2014). Vagus nerve stimulation: A new bioelectronics approach to treat rheumatoid arthritis? *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, 28(4), 625–635. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2014.10.015>
- Kopciuch, D., Barciszewska, A. M., Fliciński, J., Paczkowska, A., Winczewska-Wiktor, A., Jankowski, R., Steinborn, B., & Nowakowska, E. (2019). Economic and clinical evaluation of vagus nerve stimulation therapy. *Acta Neurologica Scandinavica*, May, 1–8. <https://doi.org/10.1111/ane.13137>
- Korotkov, A., Broekart, D. W. M., van Scheppingen, J., Anink, J. J., Baayen, J. C., Idema, S., Gorter, J. A., Aronica, E., & van Vliet, E. A. (2018). Increased expression of matrix metalloproteinase 3 can be attenuated by inhibition of microRNA-155 in cultured human astrocytes. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12974-018-1245-Y>
- Krahl, S. E., & Clark, K. B. (2012). Vagus nerve stimulation for epilepsy: A review of central mechanisms. *Surgical Neurology International*, 3(Suppl 4), S255. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.103015>
- Krahl, S. E., Clark, K. B., Smith, D. C., & Browning, R. A. (1998). Locus Coeruleus Lesions Suppress the Seizure-Attenuating Effects of Vagus Nerve Stimulation. *Epilepsia*, 39(7), 709–714. <https://doi.org/10.1111/J.1528-1157.1998.TB01155.X>
- Krahl, S. E., Senanayake, S. S., & Handforth, A. (2001). Destruction of peripheral C-fibers does not alter subsequent vagus nerve stimulation-induced seizure suppression in rats. *Epilepsia*, 42(5), 586–589. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.09700.x>
- Krahl, S. E., Senanayake, S. S., & Handforth, A. (2003). Right-sided vagus nerve stimulation reduces generalized seizure severity in rats as effectively as left-sided. *Epilepsy Research*, 56(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(03\)00122-0](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(03)00122-0)
- Kuba, R., Brázdil, M., Kalina, M., Procházka, T., Hovorka, J., Nežádal, T., Hadač, J., Brožová, K., Sebroňová, V., Komárek, V., Marusič, P., Ošlejšková, H., Zárubová, J., & Rektor, I. (2009). Vagus nerve stimulation: Longitudinal follow-up of patients treated for 5 years. *Seizure*, 18(4), 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2008.10.012>
- Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A. T., Brodie, M. J., Hauser, W. A., Mathern, G., Moshé, S. L., Perucca, E., Wiebe, S., & French, J. (2010). Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 51(6), 1069–1077. <https://doi.org/10.1111/J.1528-1167.2009.02397.X>
- Labar, D. R. (2002). Antiepileptic drug use during the first 12 months of vagus nerve stimulation therapy: a registry study. *Neurology*, 59(6 Suppl 4). https://doi.org/10.1212/WNL.59.6_SUPPL_4.S38
- Lampros, M., Vlachos, N., Zigouris, A., Voulgaris, S., & Alexiou, G. A. (2021). Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation (t-VNS) and epilepsy: A systematic review of the literature. *Seizure*, 91(March), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2021.05.017>
- Lange, G., Janal, M. N., Maniker, A., Fitzgibbons, J., Fobler, M., Cook, D., & Natelson, B. H. (2011). Safety and Efficacy of Vagus Nerve Stimulation in Fibromyalgia: A Phase I/II Proof of Concept Trial. *Pain Medicine*, 12(9). <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2011.01203.x>
- Lanska, D. J. (2002). J.L. Corning and vagal nerve stimulation for seizures in the 1880s. *Neurology*, 58(3), 452–459. <https://doi.org/10.1212/WNL.58.3.452>
- Larsen, L. E., Wadman, W. J., Van Mierlo, P., Delbeke, J., Grimonprez, A., Van Nieuwenhuyse, B., Portelli, J., Boon, P., Vonck, K., & Raedt, R. (2016). Modulation of Hippocampal Activity by Vagus Nerve Stimulation in Freely Moving Rats. *Brain Stimulation*, 9(1). <https://doi.org/10.1016/j.brs.2015.09.009>

- Lazarini-Lopes, W., Campos-Rodriguez, C., Palmer, D., N’Gouemo, P., Garcia-Cairasco, N., & Forcelli, P. A. (2021). Absence epilepsy in male and female WAG/Rij rats: A longitudinal EEG analysis of seizure expression. *Epilepsy Research*, 176. <https://doi.org/10.1016/J.EPLEPSYRES.2021.106693>
- Lee, C. C., Chou, C. C., Hsiao, F. J., Chen, Y. H., Lin, C. F., Chen, C. J., Peng, S. J., Liu, H. L., & Yu, H. Y. (2022). Pilot study of focused ultrasound for drug-resistant epilepsy. *Epilepsia*, 63(1), 162. <https://doi.org/10.1111/EPL.17105>
- Liu, C., Chu, D., Kalantar-Zadeh, K., George, J., Young, H. A., & Liu, G. (2021). Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 8(15). <https://doi.org/10.1002/ADVS.202004433>
- Liu, W. C., Mosier, K., Kalnin, A. J., & Marks, D. (2003). BOLD fMRI activation induced by vagus nerve stimulation in seizure patients. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 74(6), 811–813. <https://doi.org/10.1136/JNNP.74.6.811>
- Lockard, J. S., Congdon, W. C., & DuCharme, L. L. (1990). Feasibility and safety of vagal stimulation in monkey model. *Epilepsia*, 31 Suppl 2, S20–S26. <https://doi.org/10.1111/J.1528-1157.1990.TB05844.X>
- López-López, D., Gómez-Nieto, R., Herrero-Turrión, M. J., García-Cairasco, N., Sánchez-Benito, D., Ludeña, M. D., & López, D. E. (2017). Overexpression of the immediate-early genes Egr1, Egr2, and Egr3 in two strains of rodents susceptible to audiogenic seizures. *Epilepsy and Behavior*, 71, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.020>
- Löscher, W. (2011). Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*, 20(5), 359–368. <https://doi.org/10.1016/J.SEIZURE.2011.01.003>
- Löscher, W. (2017). Animal Models of Drug-Refractory Epilepsy. *Models of Seizures and Epilepsy: Second Edition*, 743–760. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804066-9.00051-1>
- Löscher, W., & Hönack, D. (1989). Comparison of the anticonvulsant efficacy of primidone and phenobarbital during chronic treatment of amygdala-kindled rats. *European Journal of Pharmacology*, 162(2), 309–322. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(89\)90294-X](https://doi.org/10.1016/0014-2999(89)90294-X)
- Löscher, W., Hönack, D., & Rundfeldt, C. (1998). Antiepileptogenic effects of the novel anticonvulsant levetiracetam (ucb L059) in the kindling model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284(2), 474–479.
- Löscher, W., & Klein, P. (2020). The feast and famine: Epilepsy treatment and treatment gaps in early 21st century. *Neuropharmacology*, 170, 108055. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2020.108055>
- Löscher, W., & Klein, P. (2021). The Pharmacology and Clinical Efficacy of Antiseizure Medications: From Bromide Salts to Cenobamate and Beyond. *CNS Drugs* 2021 35:9, 35(9), 935–963. <https://doi.org/10.1007/S40263-021-00827-8>
- Löscher, W., & Rogawski, M. A. (2012). How theories evolved concerning the mechanism of action of barbiturates. *Epilepsia*, 53, 12–25. <https://doi.org/10.1111/EPL.12025>
- Löscher, W., & Schmidt, D. (1988). Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Research*, 2(3), 145–181. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(88\)90054-X](https://doi.org/10.1016/0920-1211(88)90054-X)
- Lyubashina, O., & Panteleev, S. (2009). Effects of cervical vagus nerve stimulation on amygdala-evoked responses of the medial prefrontal cortex neurons in rat. *Neuroscience Research*, 65(1). <https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.06.002>
- Madsen, T. M., Bolwig, T. G., & Mikkelsen, J. D. (2006). Differential regulation of c-fos and fosB in the rat brain after amygdala kindling. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 26(1), 87–100. <https://doi.org/10.1007/S10571-006-9202-1/METRICS>
- Magdaleno-Madrigal, V. M., Martínez-Vargas, D., Valdés-Cruz, A., Almazán-Alvarado, S., & Fernández-Mas, R. (2010). Preemptive effect of nucleus of the solitary tract stimulation on amygdaloid kindling in freely moving cats. *Epilepsia*, 51(3), 438–444. <https://doi.org/10.1111/J.1528-1167.2009.02337.X>
- Magdaleno-Madrigal, V. M., Valdés-Cruz, A., Martínez-Vargas, D., Martínez, A., Almazán, S., Fernández-Mas, R., & Fernández-Guardiola, A. (2002). Effect of electrical stimulation of the nucleus of the solitary tract on the development of electrical amygdaloid kindling in the cat. *Epilepsia*, 43(9), 964–969. <https://doi.org/10.1046/J.1528-1157.2002.05702.X>
- Majoie, H. J. M., Rijkers, K., Berfelo, M. W., Hulsman, J. A. R. J., Myint, A., Schwarz, M., & Vles, J. S. H. (2010). Vagus nerve stimulation in refractory epilepsy: Effects on pro-and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood. *NeuroImmunoModulation*, 18(1), 52–56. <https://doi.org/10.1159/000315530>

- Manley, N. C., Bertrand, A. A., Kinney, K. S., Hing, T. C., & Sapolsky, R. M. (2007). Characterization of monocyte chemoattractant protein-1 expression following a kainate model of status epilepticus. *Brain Research*, 1182(1), 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.08.092>
- Manta, S., Dong, J., Debonnel, G., & Blier, P. (2009). Enhancement of the function of rat serotonin and norepinephrine neurons by sustained vagus nerve stimulation. *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN*, 34(4), 272. [/pmc/articles/PMC2702444/](https://doi.org/10.1016/j.jpn.2009.04.002)
- Mao, H., Chen, Y., Ge, Q., Ye, L., & Cheng, H. (2022). Short- and Long-Term Response of Vagus Nerve Stimulation Therapy in Drug-Resistant Epilepsy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuromodulation*, 25(3). <https://doi.org/10.1111/ner.13509>
- Marangell, L. B., Suppes, T., Zboyan, H. A., Prashad, S. J., Fischer, G., Snow, D., Sureddi, S., & Allen, J. C. (2008). A 1-year pilot study of vagus nerve stimulation in treatment-resistant rapid-cycling bipolar disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, 69(2). <https://doi.org/10.4088/JCP.v69n0203>
- Marrosu, F., Serra, A., Maleci, A., Puligheddu, M., Biggio, G., & Piga, M. (2003). Correlation between GABAA receptor density and vagus nerve stimulation in individuals with drug-resistant partial epilepsy. *Epilepsy Research*, 55(1–2), 59–70. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(03\)00107-4](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(03)00107-4)
- Marshall, G. F., Gonzalez-Sulser, A., & Abbott, C. M. (2021). Modelling epilepsy in the mouse: challenges and solutions. *Disease Models & Mechanisms*, 14(3). <https://doi.org/10.1242/DMM.047449>
- Marshall, R., Taylor, I., Lahr, C., Abell, T. L., Espinoza, I., Gupta, N. K., & Gomez, C. R. (2015). Bioelectrical stimulation for the reduction of inflammation in inflammatory bowel disease. *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology*, 8, 55–59. <https://doi.org/10.4137/CGast.S31779>
- Martín, J., Tur Mari, J. A., & Orellana Muriana, J. M. (2008). Ciencia y tecnología del animal de laboratorio. Universidad de Alcalá (Ed.), *Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio*. Editorial Universidad de Alcalá.
- Martorell-Llobregat, C., González-López, P., Luna, E., Asensio-Asensio, M., Jadraque-Rodríguez, R., García-March, G., & Moreno-López, P. (2022). Papel de la estimulación del nervio vago en el tratamiento de la epilepsia refractaria. Resultados clínicos e impacto en la calidad de vida. *Neurología*, 37(6), 450–458. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2019.04.002>
- Mazarati, A. M., Lewis, M. L., & Pittman, Q. J. (2017). Neurobehavioral comorbidities of epilepsy: Role of inflammation. *Epilepsia*, 58 Suppl 3, 48–56. <https://doi.org/10.1111/EPL.13786>
- Mazdeh, M., Omrani, M. D., Sayad, A., Komaki, A., Arsang-Jang, S., Taheri, M., & Ghafouri-Fard, S. (2018). Expression analysis of cytokine coding genes in epileptic patients. *Cytokine*, 110, 284–287. <https://doi.org/10.1016/j.cyt.2018.01.017>
- McGregor, A., Wheless, J., Baumgartner, J., & Bettis, D. (2005). Right-sided vagus nerve stimulation as a treatment for refractory epilepsy in humans. *Epilepsia*, 46(1), 91–96. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.16404.x>
- McLachlan RS (1993). Suppression of interictal spikes and seizures by stimulation of the vagus nerve. *Epilepsia* 34, 918-23. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1993.tb02112.x>
- McIntire, L., Goodyear, C., & McKinley, A. (2019). Peripheral nerve stimulation to augment human analyst performance. *2019 IEEE Research and Applications of Photonics in Defense Conference, RAPID 2019 - Proceedings*. <https://doi.org/10.1109/RAPID.2019.8864297>
- Meregnani, J., Clarençon, D., Vivier, M., Peinnequin, A., Mouret, C., Sinniger, V., Picq, C., Job, A., Canini, F., Jacquier-Sarlin, M., & Bonaz, B. (2011). Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation in a rat model of inflammatory bowel disease. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 160(1–2), 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2010.10.007>
- Mollet, L., Raedt, R., Delbeke, J., El Tahry, R., Grimonprez, A., Dauwe, I., De Herdt, V., Meurs, A., Wadman, W., Boon, P., & Vonck, K. (2013). Electrophysiological responses from vagus nerve stimulation in rats. *International Journal of Neural Systems*, 23(6). <https://doi.org/10.1142/S0129065713500275>
- Mondal, B., Choudhury, S., Simon, B., Baker, M. R., & Kumar, H. (2019). Noninvasive vagus nerve stimulation improves gait and reduces freezing of gait in Parkinson's disease. In *Movement Disorders* (Vol. 34, Issue 6). <https://doi.org/10.1002/mds.27662>
- Morgan, J. I., Cohen, D. R., Hempstead, J. L., & Curran, T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science (New York, N.Y.)*, 237(4811), 192–197. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.3037702>
- Morin, L. P., & Wood, R. I. (2001). *A stereotaxic atlas of the golden hamster brain*. Academic.
- Morris 3rd, G. L., & Mueller, W. M. (1999). Long-term treatment with vagus nerve stimulation in patients with refractory epilepsy. The Vagus Nerve Stimulation Study Group E01-E05. *Neurology*, 53(8).

- Mraovitch, S., & Calando, Y. (1999). Interactions between limbic, thalamo-striatal-cortical, and central autonomic pathways during epileptic seizure progression. *The Journal of Comparative Neurology*, 411(1), 145–161. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990816\)411:1<145::AID-CNE11>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990816)411:1<145::AID-CNE11>3.0.CO;2-1)
- Muñoz, L. J., Carballosa-Gautam, M. M., Yanowsky, K., García-Atarés, N., & López, D. E. (2017). The genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca: The GASH:Sal. *Epilepsy and Behavior*, 71, 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.03.002>
- Murphree, L. J., Rundhaugen, L. M., & Kelly, K. M. (2007). Animal models of geriatric epilepsy. *International Review of Neurobiology*, 81, 29–40. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(06\)81003-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(06)81003-2)
- Muthiah, N., Akwayena, E., Vodovotz, L., Sharma, N., Jeong, J. H., White, G. E., & Abel, T. J. (2022). Comparison of traditional and closed loop vagus nerve stimulation for treatment of pediatric drug-resistant epilepsy: A propensity-matched retrospective cohort study. *Seizure*, 94. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2021.11.016>
- Naritoku, D. K., Terry, W. J., & Helfert, R. H. (1995). EPILEPSY RESEARCH Regional induction of fos immunoreactivity in the brain by anticonvulsant stimulation of the vagus nerve. *Epilepsy Research*, 22, 53–62.
- Navas, M., Navarrete, E. G., Pascual, J. M., Carrasco, R., Núñez, J. A., Shakur, S. F., Pastor, J., & Sola, R. G. (2010). Treatment of refractory epilepsy in adult patients with right-sided vagus nerve stimulation. *Epilepsy Research*, 90(1–2), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2010.04.007>
- Nestler, E. J. (2015). Δ FosB: a transcriptional regulator of stress and antidepressant responses. *European Journal of Pharmacology*, 753, 66. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2014.10.034>
- Neuhuber, W. L., & Berthoud, H. R. (2021). Functional anatomy of the vagus system – Emphasis on the somato-visceral interface. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 236, 102887. <https://doi.org/10.1016/J.AUTNEU.2021.102887>
- Ngan Kee, N., Foster, E., Marquina, C., Tan, A., Pang, S. S. T., O'Brien, T. J., Kwan, P., Jackson, G. D., Chen, Z., & Ademi, Z. (2023). Systematic Review of Cost-Effectiveness Analysis for Surgical and Neurostimulation Treatments for Drug-Resistant Epilepsy in Adults. *Neurology*, 100(18), e1866–e1877. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000207137>
- Ngugi, A. K., Bottomley, C., Kleinschmidt, I., Sander, J. W., & Newton, C. R. (2010). Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia*, 51(5), 883–890. <https://doi.org/10.1111/J.1528-1167.2009.02481.X>
- Noller, C. M., Levine, Y. A., Urakov, T. M., Aronson, J. P., & Nash, M. S. (2019). Vagus Nerve Stimulation in Rodent Models: An Overview of Technical Considerations. *Frontiers in Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00911>
- Ohno, Y., Shimizu, S., Harada, Y., Morishita, M., Ishihara, S., Kumafuji, K., Sasa, M., & Serikawa, T. (2009). Regional expression of Fos-like immunoreactivity following seizures in Noda epileptic rat (NER). *Epilepsy Research*, 87(1), 70–76. <https://doi.org/10.1016/J.EPLEPSYRES.2009.07.012>
- Oishi, R., & Suenaga, N. (1982). The role of the locus coeruleus in regulation of seizure susceptibility in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, 32(6), 1075–1081. [https://doi.org/10.1016/s0021-5198\(19\)52597-5](https://doi.org/10.1016/s0021-5198(19)52597-5)
- Okdahl, T., Bertoli, D., Brock, B., Krogh, K., Krag Knop, F., Brock, C., & Drewes, A. M. (2021). Study protocol for a multicentre, randomised, parallel group, sham-controlled clinical trial investigating the effect of transcutaneous vagal nerve stimulation on gastrointestinal symptoms in people with diabetes complicated with diabetic autonomic neuropathy: The DAN-VNS Study. *BMJ Open*, 11(1). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-038677>
- Okudan, Z. V., & Özkara, Ç. (2018). Reflex epilepsy: Triggers and management strategies. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 14, 327–337. <https://doi.org/10.2147/NDT.S107669>
- Olofsson, P. S., Levine, Y. A., Caravaca, A., Chavan, S. S., Pavlov, V. A., Faltys, M., & Tracey, K. J. (2015). Single-Pulse and Unidirectional Electrical Activation of the Cervical Vagus Nerve Reduces Tumor Necrosis Factor in Endotoxemia. 37–42. <https://doi.org/10.15424/bioelectronmed.2015.00006>
- Olofsson, P. S., Rosas-Ballina, M., Levine, Y. A., & Tracey, K. J. (2012). Rethinking inflammation: Neural circuits in the regulation of immunity. *Immunological Reviews*, 248(1). <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01138.x>
- Orosz, I., McCormick, D., Zamponi, N., Varadkar, S., Feucht, M., Parain, D., Griens, R., Vallée, L., Boon, P., Rittey, C., Jayewardene, A. K., Bunker, M., Arzimanoglou, A., & Lagae, L. (2014). Vagus nerve stimulation for drug-resistant epilepsy: a European long-term study up to 24 months in 347 children. *Epilepsia*, 55(10), 1576–1584. <https://doi.org/10.1111/EPI.12762>

- Osharina, V., Bagaev, V., Wallois, F., & Larnicol, N. (2006). Autonomic response and Fos expression in the NTS following intermittent vagal stimulation: Importance of pulse frequency. *Autonomic Neuroscience*, 126–127, 72–80. <https://doi.org/10.1016/J.AUTNEU.2006.03.011>
- Ottaviani, M. M., Vallone, F., Micera, S., & Recchia, F. A. (2022). Closed-Loop Vagus Nerve Stimulation for the Treatment of Cardiovascular Diseases: State of the Art and Future Directions. In *Frontiers in Cardiovascular Medicine* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.866957>
- Pack, A. M. (2013). Trigeminal Nerve Stimulation May Not Be Effective for the Treatment of Refractory Partial Seizures. *Epilepsy Currents*, 13(4), 164. <https://doi.org/10.5698/1535-7597-13.4.164>
- Paintal, A. S. (1973). Vagal sensory receptors and their reflex effects. *Physiological Reviews*, 53(1), 159–227 <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.1973.53.1.159>
- Panebianco, M., Rigby, A., & Marson, A. G. (2022). Vagus nerve stimulation for focal seizures. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2022, 7. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002896.pub3>
- Panebianco, M., Zavanone, C., Dupont, S., Restivo, D. A., & Pavone, A. (2016). Vagus nerve stimulation therapy in partial epilepsy: a review. *Acta Neurologica Belgica*, 116(3), 241–248. <https://doi.org/10.1007/s13760-016-0616-3>
- Penry, J. K., & Dean, J. C. (1990). Prevention of intractable partial seizures by intermittent vagal stimulation in humans: Preliminary results. *Epilepsia*, 31(SUPPL. 2), S40–S43. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed2&NEWS=N&AN=1991008035>
- Picazo, M. G., Benito, P. J., & García-Olmo, D. C. (2009). Efficiency and safety of a technique for drawing blood from the hamster cranial vena cava. *Lab Animal*, 38(6), 211–216. <https://doi.org/10.1038/labon0609-211>
- Piper, R. J., Richardson, R. M., Worrell, G., Carmichael, D. W., Baldeweg, T., Litt, B., Denison, T., & Tisdall, M. M. (2022). Towards network-guided neuromodulation for epilepsy. *Brain*, 145(10), 3347. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAC234>
- Potschka, H. (2012). Animal models of drug-resistant epilepsy. *Epileptic Disorders*, 14(3), 226–234. <https://doi.org/10.1684/epd.2012.0532>
- Prieto-Martín, A. I., Aroca-Aguilar, J. D., Sánchez-Sánchez, F., Muñoz, L. J., López, D. E., Escribano, J., & de Cabo, C. (2017). Molecular and neurochemical substrates of the audiogenic seizure strains: The GASH:Sal model. *Epilepsy and Behavior*, 71, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.05.025>
- Prieto-Martín, A. I., Llorens, S., Pardal-Fernández, J. M., Muñoz, L. J., López, D. E., Escribano, J., Nava, E., & De Cabo, C. (2012). Opposite caudal versus rostral brain nitric oxide synthase response to generalized seizures in a novel rodent model of reflex epilepsy. *Life Sciences*, 90(13–14), 531–537. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.01.010>
- Pruitt, D. T., Danaphongse, T. T., Lutchman, M., Patel, N., Reddy, P., Wang, V., Parashar, A., Rennaker, R. L., Kilgard, M. P., & Hays, S. A. (2021). Optimizing Dosing of Vagus Nerve Stimulation for Stroke Recovery. *Translational Stroke Research*, 12(1). <https://doi.org/10.1007/s12975-020-00829-6>
- Raedt, R., Clinckers, R., Mollet, L., Vonck, K., El Tahry, R., Wyckhuys, T., De Herdt, V., Carrette, E., Wadman, W., Michotte, Y., Smolders, I., Boon, P., & Meurs, A. (2011). Increased hippocampal noradrenaline is a biomarker for efficacy of vagus nerve stimulation in a limbic seizure model. *Journal of Neurochemistry*, 117(3), 461–469. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2011.07214.X>
- Rana, A., & Musto, A. E. (2018). The role of inflammation in the development of epilepsy. *Journal of Neuroinflammation* 2018 15:1, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12974-018-1192-7>
- Rempe, R. G., Hartz, A. M. S., Soldner, E. L. B., Sokola, B. S., Alluri, S. R., Abner, E. L., Kryscio, R. J., Pekcec, A., Schlichtiger, J., & Bauer, B. (2018). Matrix Metalloproteinase-Mediated Blood-Brain Barrier Dysfunction in Epilepsy. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 38(18), 4301–4315. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2751-17.2018>
- Retchkiman, I., Fischer, B., Platt, D., & Wagner, A. P. (1996). Seizure induced c-fos mRNA in the rat brain: comparison between young and aging animals. *Neurobiology of Aging*, 17(1), 41–44. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)00222-5](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)00222-5)
- Roosevelt, R. W., Smith, D. C., Clough, R. W., Jensen, R. A., & Browning, R. A. (2006). Increased extracellular concentrations of norepinephrine in cortex and hippocampus following vagus nerve stimulation in the rat. *Brain Research*, 1119(1). <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.08.048>
- Roslin, M., & Kurian, M. (2001). The Use of Electrical Stimulation of the Vagus Nerve to Treat Morbid Obesity. *Epilepsy & Behavior*, 2(3), S11–S16. <https://doi.org/10.1006/EBEH.2001.0213>
- Rugg-Gunn, F., Miserocchi, A., & McEvoy, A. (2020). Epilepsy surgery. *Practical Neurology*, 20(1), 4–14. <https://doi.org/10.1136/PRACTNEUROL-2019-002192>

- Ryvlin, P., Gilliam, F. G., Nguyen, D. K., Colicchio, G., Iudice, A., Tinuper, P., Zamponi, N., Aguglia, U., Wagner, L., Minotti, L., Stefan, H., Boon, P., Sadler, M., Benna, P., Raman, P., & Perucca, E. (2014). The long-term effect of vagus nerve stimulation on quality of life in patients with pharmacoresistant focal epilepsy: The PuLsE (Open Prospective Randomized Long-term Effectiveness) trial. *Epilepsia*, 55(6), 893. <https://doi.org/10.1111/EPI.12611>
- Ryvlin, P., Rheims, S., Hirsch, L. J., Sokolov, A., & Jehi, L. (2021). Neuromodulation in epilepsy: state-of-the-art approved therapies. *The Lancet. Neurology*, 20(12), 1038–1047. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00300-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00300-8)
- Sánchez-Benito, D., Gómez-Nieto, R., Hernández-Noriega, S., Murashima, A. A. B., de Oliveira, J. A. C., Garcia-Cairasco, N., López, D. E., & Hyppolito, M. A. (2017). Morphofunctional alterations in the olivocochlear efferent system of the genetic audiogenic seizure-prone hamster GASH:Sal. *Epilepsy and Behavior*, 71, 193–206. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.05.040>
- Sánchez-Benito, D., Hyppolito, M. A., Alvarez-Morujó, A. J., López, D. E., & Gómez-Nieto, R. (2020). Morphological and molecular correlates of altered hearing sensitivity in the genetically audiogenic seizure-prone hamster GASH:Sal. *Hearing Research*, 392. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2020.107973>
- Sangare, A., Marchi, A., Pruvost-Robieux, E., Soufflet, C., Crepon, B., Ramdani, C., Chassoux, F., Turak, B., Landre, E., & Gavaret, M. (2020). The effectiveness of vagus nerve stimulation in drug-resistant epilepsy correlates with vagus nerve stimulation-induced electroencephalography desynchronization. *Brain Connectivity*, 10(10). <https://doi.org/10.1089/brain.2020.0798>
- Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y. H., & Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512–521. <https://doi.org/10.1111/EPI.13709>
- Schmidt, D. (2011). Efficacy of New Antiepileptic Drugs. *Epilepsy Currents*, 11(1), 9. <https://doi.org/10.5698/1535-7511-11.1.9>
- Schmidt, D. (2016). Drug treatment strategies for epilepsy revisited: starting early or late? One drug or several drugs? *Epileptic Disorders: International Epilepsy Journal with Videotape*, 18(4), 356–366. <https://doi.org/10.1684/EPD.2016.0882>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/NMETH.2089>
- Schwarz, L. A., & Luo, L. (2015). Organization of the locus coeruleus-norepinephrine system. *Current Biology*, 25(21), R1051–R1056. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.039>
- Seidenberg, M., Pulsipher, D. T., & Hermann, B. (2009). Association of epilepsy and comorbid conditions. *Future Neurology*, 4(5), 663. <https://doi.org/10.2217/FNL.09.32>
- Silberstein, S. D., Mechtler, L. L., Kudrow, D. B., Calhoun, A. H., McClure, C., Saper, J. R., Liebler, E. J., Rubenstein Engel, E., & Tepper, S. J. (2016). Non-Invasive Vagus Nerve Stimulation for the ACute Treatment of Cluster Headache: Findings From the Randomized, Double-Blind, Sham-Controlled ACT1 Study. *Headache*, 56(8). <https://doi.org/10.1111/head.12896>
- Sinniger, V., Pellissier, S., Fauvelle, F., Trocmé, C., Hoffmann, D., Vercueil, L., Cracowski, J. L., David, O., & Bonaz, B. (2020). A 12-month pilot study outcomes of vagus nerve stimulation in Crohn's disease. *Neurogastroenterology and Motility*, 32(10). <https://doi.org/10.1111/nmo.13911>
- Sjögren, M. J. C., Hellström, P. T. O., Jonsson, M. A. G., Runnerstam, M., Silander, H. C. son, & Ben-Menachem, E. (2002). Cognition-enhancing effect of vagus nerve stimulation in patients with Alzheimer's disease: A pilot study. *Journal of Clinical Psychiatry*, 63(11). <https://doi.org/10.4088/JCP.v63n1103>
- Skiba, A., Pellegata, D., Morozova, V., Koziół, E., Budzyńska, B., Lee, S. M. Y., Gertsch, J., & Skalicka-Woźniak, K. (2023). Pharmacometabolic Effects of Pteryxin and Valproate on Pentylenetetrazole-Induced Seizures in Zebrafish Reveal Vagus Nerve Stimulation. *Cells*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/CELLS12111540>
- Skrehot, H. C., Englot, D. J., & Haneef, Z. (2023). Neuro-stimulation in focal epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsy and Behavior*, 142. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2023.109182>
- Smith, C. D., Geddes, L. A., Bourland, J. D., Foster, K. S., & Schoenlein, W. E. (2001). The chronaxie and propagation velocity of canine cervical vagus nerve fibers in vivo. *Cardiovascular Engineering*, 1(2).
- Sperling, M. R., Barshow, S., Nei, M., & Asadi-Pooya, A. A. (2016). A reappraisal of mortality after epilepsy surgery. *Neurology*, 86(21), 1938–1944. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002700>

- Spuck, S., Nowak, G., Renneberg, A., Tronnier, V., & Sperner, J. (2008). Right-sided vagus nerve stimulation in humans: An effective therapy? *Epilepsy Research*, 82(2–3), 232–234. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2008.08.003>
- Stegeman, I., Velde, H. M., Robe, P. A. J. T., Stokroos, R. J., & Smit, A. L. (2021). Tinnitus treatment by vagus nerve stimulation: A systematic review. *PLoS ONE*, 16(3 March). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247221>
- Sudbrack-Oliveira, P., Barbosa, M. Z., Thome-Souza, S., Razza, L. B., Gallucci-Neto, J., da Costa Lane Valiengo, L., & Brunoni, A. R. (2021). Transcranial direct current stimulation (tDCS) in the management of epilepsy: A systematic review. *Seizure*, 86, 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.SEIZURE.2021.01.020>
- Tang, F., Hartz, A. M. S., & Bauer, B. (2017). Drug-Resistant Epilepsy: Multiple Hypotheses, Few Answers. *Frontiers in Neurology*, 8, 275386. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2017.00301>
- Tassorelli, C., Grazi, L., De Tommaso, M., Pierangeli, G., Martelletti, P., Rainero, I., Dorlas, S., Geppetti, P., Ambrosini, A., Sarchielli, P., Liebler, E., Barbanti, P., Bitetto, V., De Icco, R., Martinelli, D., Sances, G., Bianchi, M., Padovan, A. M., Ricci, K., ... Di Maro, D. (2018). Noninvasive vagus nerve stimulation as acute therapy for migraine: The randomized PRESTO study. *Neurology*, 91(4). <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005857>
- Terry, R. S., Tarver, W. B., & Zabara, J. (1991). The Implantable Neurocybernetic Prosthesis System. *Pacing and Clinical Electrophysiology*, 14(1), 86–93. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8159.1991.tb04052.x>
- Theodore, W. H. (2003). Does Serotonin Play a Role in Epilepsy? *Epilepsy Currents*, 3(5), 173. <https://doi.org/10.1046/J.1535-7597.2003.03508.X>
- Thompson, S. L., O’Leary, G. H., Austelle, C. W., Gruber, E., Kahn, A. T., Manett, A. J., Short, B., & Badran, B. W. (2021). A Review of Parameter Settings for Invasive and Non-invasive Vagus Nerve Stimulation (VNS) Applied in Neurological and Psychiatric Disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 709436. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2021.709436/BIBTEX>
- Toffa, D. H., Touma, L., El Mesquine, T., Bouthillier, A., & Nguyen, D. K. (2020). Learnings from 30 years of reported efficacy and safety of vagus nerve stimulation (VNS) for epilepsy treatment: A critical review. *Seizure*, 83. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2020.09.027>
- Tornero, C., Pastor, E., Garzando, M. del M., Orduña, J., Forner, M. J., Bocigas, I., Cedeño, D. L., Vallejo, R., McClure, C. K., Czura, C. J., Liebler, E. J., & Staats, P. (2022). Non-invasive Vagus Nerve Stimulation for COVID-19: Results From a Randomized Controlled Trial (SAVIOR I). *Frontiers in Neurology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.820864>
- Tracey Kevin J. (2005). The inflammatory reflex. *Nature*, 257(2), 122–125. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2004.01440.x>
- Travagli, R. A., & Anselmi, L. (2016). Vagal neurocircuitry and its influence on gastric motility. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 13(7), 389–401. <https://doi.org/10.1038/NRGASTRO.2016.76>
- Tubbs, R. S., Salter, E. G., Killingsworth, C., Rollins, D. L., Smith, W. M., Ideker, R. E., Wellons, J. C., Blount, J. P., & Oakes, W. J. (2007). Right-sided vagus nerve stimulation inhibits induced spinal cord seizures. *Clinical Anatomy (New York, N.Y.)*, 20(1), 23–26. <https://doi.org/10.1002/CA.20253>
- Ted L Tewfik, T.D. (8 de diciembre de 2017). Vagus Nerve Anatomy. Medscape Reference. Recuperado el 1 de julio de 2023 de <https://emedicine.medscape.com/article/1875813>
- Tzadok, M., Harush, A., Nissenkorn, A., Zauberman, Y., Feldman, Z., & Ben-zeev, B. (2019). Clinical outcomes of closed-loop vagal nerve stimulation in patients with refractory epilepsy. *Seizure*, 71(May), 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2019.07.006>
- Vakharia, V. N., Duncan, J. S., Witt, J. A., Elger, C. E., Staba, R., & Engel, J. (2018). Getting the best outcomes from epilepsy surgery. *Annals of Neurology*, 83(4), 676. <https://doi.org/10.1002/ANA.25205>
- Valencia-Calderón, C., Rumià-Arboix, J., Conesa-Bertran, G., Calderón-Valdiviezo, A., Barrio-Fernández, P., González-Alarcón, J., & Gutiérrez-Morales, J. (2021). Current status of epilepsy surgery in Spain. Compendium and awareness. *Revista de Neurologia*, 72(3), 92–102. <https://doi.org/10.33588/RN.7203.2020361>
- Vargas-Caballero, M., Warming, H., Walker, R., Holmes, C., Cruickshank, G., & Patel, B. (2022). Vagus Nerve Stimulation as a Potential Therapy in Early Alzheimer’s Disease: A Review. *Frontiers in Human Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2022.866434>
- Varvel, N. H., Neher, J. J., Bosch, A., Wang, W., Ransohoff, R. M., Miller, R. J., & Dingledine, R. (2016). Infiltrating monocytes promote brain inflammation and exacerbate neuronal damage after status epilepticus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(38), E5665–E5674. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1604263113>

- Vespa, S., Stumpp, L., Bouckaert, C., Delbeke, J., Smets, H., Cury, J., Ferrao Santos, S., Rooijackers, H., Nonclercq, A., Raedt, R., Vonck, K., & El Tahry, R. (2019). Vagus nerve stimulation-induced laryngeal motor evoked potentials: A possible biomarker of effective nerve activation. *Frontiers in Neuroscience*, 13(AUG). <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00880>
- Vezzani, A., Conti, M., De Luigi, A., Ravizza, T., Moneta, D., Marchesi, F., & De Simoni, M. G. (1999). Interleukin-1 β immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(12), 5054–5065. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-12-05054.1999>
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M. M., Bartfai, T., Binaglia, M., Corsini, E., Di Luca, M., Galli, C. L., & Marinovich, M. (2003). Interleukin-1 β enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(25), 8692–8700. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-25-08692.2003>
- Vonck, K., Boon, P., Van Laere, K., D'Havé, M., Vandekerckhove, T., O'Connor, S., Brans, B., Dierckx, R., & De Reuck, J. (2000). Acute single photon emission computed tomographic study of vagus nerve stimulation in refractory epilepsy. *Epilepsia*, 41(5). <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb00215.x>
- Wada, J. A., Terao, A., White, B., & Jung, E. (1970). Inferior colliculus lesion and audiogenic seizure susceptibility. *Experimental Neurology*, 28(2), 326–332. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(70\)90240-2](https://doi.org/10.1016/0014-4886(70)90240-2)
- Walker, B. R., Easton, A., & Gale, K. (1999). Regulation of limbic motor seizures by GABA and glutamate transmission in nucleus tractus solitarius. *Epilepsia*, 40(8), 1051–1057. <https://doi.org/10.1111/J.1528-1157.1999.TB00818.X>
- Walton, D., Spencer, D. C., Nevitt, S. J., & Michael, B. D. (2021). Transcranial magnetic stimulation for the treatment of epilepsy. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2021(4). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011025.PUB3>
- Whitehead, M. C. (1988). Neuronal architecture of the nucleus of the solitary tract in the hamster. *Journal of Comparative Neurology*, 276(4), 547–572. <https://doi.org/10.1002/CNE.902760409>
- Winston, G. M., Guadix, S., Lavieri, M. T., Uribe-Cardenas, R., Kocharian, G., Williams, N., Sholle, E., Grinspan, Z., & Hoffman, C. E. (2021). Closed-loop vagal nerve stimulation for intractable epilepsy: A single-center experience. *Seizure*, 88. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2021.03.030>
- Winter, Y., Sandner, K., Glaser, M., Ciolac, D., Sauer, V., Ziebart, A., Karakoyun, A., Chiosa, V., Saryyeva, A., Krauss, J., Ringel, F., & Groppa, S. (2023). Synergistic effects of vagus nerve stimulation and antiseizure medication. *Journal of Neurology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00415-023-11825-9>
- Woodbury, D. M., & Woodbury, J. W. (1990). Effects of Vagal Stimulation on Experimentally Induced Seizures in Rats. *Epilepsia*, 31. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1990.tb05852.x>
- Wu, Y., Wang, X., Mo, X., Xi, Z., Xiao, F., Li, J., Zhu, X., Luan, G., Wang, Y., Li, Y., & Zhang, J. (2008). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in brain tissue of patients with intractable epilepsy. *Clinical Neuropathology*, 27(2), 55–63. <https://doi.org/10.5414/NPP27055>
- Wu, Z., Zhang, X., Cai, T., Li, Y., Guo, X., Zhao, X., Wu, D., Li, Z., & Zhang, L. (2023). Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation reduces cytokine production in sepsis: An open double-blind, sham-controlled, pilot study. *Brain Stimulation*, 16(2). <https://doi.org/10.1016/j.brs.2023.02.008>
- Yang, Y., Yang, L. Y., Orban, L., Cuylear, D., Thompson, J., Simon, B., & Yang, Y. (2018). Non-invasive vagus nerve stimulation reduces blood-brain barrier disruption in a rat model of ischemic stroke. *Brain Stimulation*, 11(4), 689. <https://doi.org/10.1016/J.BRS.2018.01.034>
- Yao, G., Kang, L., Li, J., Long, Y., Wei, H., Ferreira, C. A., Jeffery, J. J., Lin, Y., Cai, W., & Wang, X. (2018). Effective weight control via an implanted self-powered vagus nerve stimulation device. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07764-z>
- Yu, Y., Ling, J., Yu, L., Liu, P., & Jiang, M. (2022). Closed-Loop Transcutaneous Auricular Vagal Nerve Stimulation: Current Situation and Future Possibilities. *Frontiers in Human Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.785620>
- Zabara J. (1985). Peripheral control of hypersynchronous discharge in epilepsy *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 61(3), S162. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(85\)90626-1](https://doi.org/10.1016/0013-4694(85)90626-1)
- Zabara, J. (1992). Inhibition of experimental seizures in canines by repetitive vagal stimulation. *Epilepsia*, 33(6), 1005–1012. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1992.tb01751.x>
- Zanchetti A, Wang SC, Moruzzi G. (1952). The effect of vagal afferent stimulation on the EEG pattern of the cat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 4, 357-61 [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(52\)90064-3](https://doi.org/10.1016/0013-4694(52)90064-3)

Zeballos, L., Sánchez Benito, D., Gonçalves Sánchez, J., Calabria, D., Gómez-Nieto, R., López, D.E. (23-25 de noviembre de 2022). *Obtention and characterization of exosomes for non-invasive monitoring*. [Póster]. VII Congreso de la Sociedad Española de Epilepsia, Santander, España.

10 Anexos

ANEXO I. Protocolo de hematoxilina-eosina

- Inmersión en xileno. 3 pases de 10 min para desparafinar
- Inmersión en alcoholes de concentración descendiente. 2 pases de 5 min
Primero en etanol 100%, luego al 96 %, 80% y finalmente 50%
- Inmersión en H₂O destilada. 5 min
- Inmersión en hematoxilina. 5 min
- Inmersión en agua corriente bajo el grifo. 5 min
- 3 lavados de 1 minuto en agua destilada
- Inmersión de 30 s en eosina
- Exposición durante 15 s en etanol al 70 %
- Inmersión de 20 s en alcohol al 96 %
- 3 lavados de 3 minutos en etanol al 100 %
- 3 inmersiones en xileno de 10 minutos
- Cubrir con Entellán® y secar antes de observar al microscopio

ANEXO II. Protocolo de inmunohistoquímica para c-Fos

- PERFUSIÓN

a) Suero Ringer para lavado de vasos. ($\pm$ 150 ml pH 6,9; 37°C)

NaCl.....	8,5 g
KCl.....	0,25 g
NaHCO ₃	0,20 g
H ₂ O.....	1000 ml

b) Fijador (1000 ml)

Disolver 40 gr de paraformaldehído en 500 ml H₂O a 70°C. Añadir 250 ml de tampón fosfato 0,4 M. Completar con H₂O destilada hasta 1000 ml.

- CRIOPROTECCIÓN

48 horas con ligera agitación y a 4°C en tampón fosfato 0,1 M en sacarosa al 30% (15 g en 50 ml).

- CORTE

Corte a 40 μ m. Muestras recogidas en pocillos con tampón fosfato 0,1 M.

- LAVADOS EN TAMPÓN FOSFATO 0,1 M para extraer la sacarosa 2 x 5 min.

- INHIBICIÓN DE LA PEROXIDASA ENDÓGENA. 15 minutos en la siguiente solución:

Tampón fosfato 0,1 M	80 ml (0,08 M)
Metanol	10 ml (10%)
H ₂ O ₂ (30 %)	10 ml (3%)

- LAVADOS EN TAMPÓN FOSFATO 0,1 M 3 x 10 min.

- LAVADOS EN TBS-TX pH 7,6 2 x 5 min. (1000 ml)
 - Tris – HCl (Sol. madre 0,5 M) 100 ml (0,05 M)
 - TritónX-100 (Sol. madre 20 %) 10 ml (0,2%)
 - H₂O 890 ml

Na Cl

- BLOQUEO INESPECÍFICO EN SUERO. Infiltrar el tejido en suero de bloqueo (Fetal calf serum al 10%) durante 90 minutos.

- INCUBACIÓN EN ANTICUERPO PRIMARIO (cFos Antibody 226 008 Synaptic Systems, Alemania) (72 h a 4°C en ligera agitación). Diluir el Ac. Primario a concentración 1:1000 en TBS-Tx 0,2% pH 7,6 añadiendo el suero de bloqueo (FCS 10%).

- LAVADOS EN TBS-TX 0,2% pH 7,6 2 x 5 min.

- INCUBACIÓN EN ANTICUERPO SECUNDARIO (Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (H+L), Biotinylated BA-1000, Vector Laboratories, Estados Unidos) (2 h a temperatura ambiente en ligera agitación). Diluir el Ac. Secundario a concentración 1:200 en TBS-Tx 0,2% pH 7,6 (FCS 10%).

- LAVADOS EN TBS-TX 0,2% pH 7,6 2 x 5 min.

- INCUBACIÓN EN ABC (2h a temperatura ambiente en agitación lenta). Diluir el ABC (Vectastain ABC kit, Peroxidase PK-4000, Vector Laboratories, Estados Unidos) en TBS-Tx 0,2% pH 7,6 (1 gota de cada reactivo del kit por cada 5 ml de solución)

- LAVADOS EN Tris-HCl pH 8 2 x 5 min (1000 ml).
 Tris – HCl (Sol. madre 0,5 M) 100ml (0,05M)
 H₂O destilada.....900 ml

- REVELADO (control visual y microscópico). En frío. Entre 6 y 12 minutos.

a) Solución stock de DAB. Disolver 10 ml de H₂O bidestilada en DAB (100 mg), hacer alícuotas de 400 µl (1%) y congelar.

b) Solución revelado:

Tris – HCl 0.05 M pH 8 25 ml
 Disolver 25mg de níquel amonio sulfato y filtrar
 1 alícuota DAB (1%) 400 µl (0,016 %)
 H₂O₂ (30 %) 5 µl (0,006%)

- MONTAJE DE LAS SECCIONES en Tris-HCl 0,05M en gelatina al 0,2%. Disolver 400 mg de gelatina en 200 ml de Tris-HCl a 60 °C. en agitación.

-SECADO DE LOS PORTAS DURANTE AL MENOS UNA NOCHE A 37°C

-CUBRIR. Inmersión en etanol 100% 3 x 10 min. Posteriormente en xileno 2 x 10 min. Cubrir con Entellán®. Dejar secar durante al menos una noche antes de observar.

ANEXO III. Artículo de investigación publicado

Research



Cite this article: Canal-Alonso A, Casado-Vara R, Castellano O, Herrera-Santos J, Gonçalves J, Màrquez-Sánchez S, Gonçalves JM, Corchado JM. 2022 An affordable implantable vagus nerve stimulator system for use in animal research. *Phil. Trans. R. Soc. A* **380**: 20210010.

<https://doi.org/10.1098/rsta.2021.0010>

Received: 15 July 2021

Accepted: 25 January 2022

One contribution of 12 to a theme issue
'Advanced neurotechnologies: translating
innovation for health and well-being'.

Subject Areas:

bioinformatics, biomedical engineering,
electrical engineering

Keywords:

epilepsy, implantable devices,
neuromodulation

Authors for correspondence:

Roberto Casado-Vara

e-mail: rccasado@ubu.es

Jesús María Gonçalves

e-mail: jgoncalves@usal.es

An affordable implantable vagus nerve stimulator system for use in animal research

Ángel Canal-Alonso^{1,2}, Roberto Casado-Vara¹,
Orlando Castellano^{2,3,4}, Jorge Herrera-Santos¹,
Jaime Gonçalves^{2,3,4}, Sergio Màrquez-Sánchez¹,
Jesús María Gonçalves^{2,4,5} and
Juan Manuel Corchado^{1,2}

¹Bioinformatics, Intelligent Systems and Educational Technology (BISITE) Research Group, Salamanca, Spain

²Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain

³Department of Cell Biology and Pathology, Faculty of Medicine,

⁴Institute of Neuroscience of Castilla y León (INCYL), and

⁵Department of Surgery, Faculty of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain

AC-A, 0000-0002-4254-5944

In this research, a vagus nerve stimulator has been developed and miniaturized for use in epilepsy research. The board contains all the components necessary for its operation during the standard duration of the experiments, being possible to control it once implanted and even being able to reuse it. The VNS system has been designed for rodents since the VNS devices available for human are not only too large for laboratory animals, but also too expensive. With this solution the expenditure on materials made by laboratories is greatly reduced and bioethical considerations were kept in mind. The system was validated in hamsters.

This article is part of the theme issue 'Advanced neurotechnologies: translating innovation for health and well-being'.

1. Introduction

Epilepsy is currently one of the most common and severe brain conditions, affecting at least 1% of the population, which means that over 70 million people worldwide suffer from it [1]. This condition expresses itself in several different forms and is characterized by the recurrence of unprovoked seizures.

The definition of epileptic seizures includes the transitory appearance of more or less severe signs and symptoms caused by excessive or simultaneous abnormal neuronal activity in the brain. Epilepsy is a debilitating disease with a significant negative impact on the patient's quality of life. Therefore, its management must consider the psychosocial dimension due to the neurobiological, cognitive, psychological and social consequences that derive from epileptic seizures [2].

Fortunately, most patients can control their symptomatology with antiepileptic drugs; however, approximately 30% of patients do not respond favourably to drug treatment. The diagnosis of these patients falls into the category of refractory epilepsy, drug-resistant epilepsy or intractable epilepsy. Refractory epilepsies present complex clinical management and are frequently associated with cognitive damage, behavioural disorders and more significant impairment of the quality of life of the patient and their family [3].

There are various alternative treatments—different from antiepileptic drugs—for patients who have refractory epilepsy. Some of these alternatives are surgical treatments. However, there are patients not suitable for surgical interventions or adverse and side effects are unacceptable. In these cases, other approaches can be followed, such as treatments based on the use of magnetic or electrical stimuli, which have varied features and offer several different possibilities [4–6].

(a) Brain stimulation in epilepsy

The stimulation of areas of the nervous system is commonly known as neuromodulation or neurostimulation. Additionally, this type of brain stimulation comprises three general branches: deep brain stimulation, cortical stimulation and extracranial stimulation. The number, classification and characteristics of these methods considerably differ, depending on the criterion of the authors. The most widely used ones, and those where clinical trials have been performed, or are on the way, are briefly discussed.

(i) Deep brain stimulation

Stimulation of deep brain areas has shown to be feasible in humans affected by different disorders. Consequently, there has been an increase in the development of technologies and procedures addressed to use deep brain stimulation (DBS) in a high number of neurological, psychiatric and other diseases. The general DBS procedure involves the placing or inserting of one or more electrodes in the selected target. These targets include the cerebellum, thalamic and basal ganglia nuclei, substantia nigra and piriform cortex since these subcortical structures, in addition to the cortex, play a crucial role in the origin, propagation and management of seizures [7,8].

The anterior nucleus of the thalamus has been the region with more promising results regarding the DBS treatment of epilepsy, which is why the FDA has approved its use [5]. Nevertheless, there is a need for larger and well-designed studies to help optimize the efficacy and safety of invasive intracranial neurostimulation treatments.

(ii) Cortical electrical stimulation

Another method used to treat epileptic seizures is cortical electrical stimulation. This procedure is commonly, but not exclusively, performed by the implantation of a subdural device. Several results show that electric pulses can reduce seizure degree or even suppress seizure activity when short-term continuous electrical stimulation in the cortex is applied. This approach, using open-loop via a cyclic or continuous manner, has also shown encouraging results for refractory epilepsy [9].

The cortical electrical stimulation procedure can be performed either in an open-loop, or in a closed-loop method, which is the most recommended in recent times. Open-loop stimulation reduced seizure frequency in the majority of patients (over 90%) [10]. At the same time, closed-loop stimulation reduces seizure frequency in a high average of 60–65% [10]. Although the procedures have only been reported in a few dozens of patients, evidence suggests that both approaches are viable choices to control refractory focal seizures.

(iii) Responsive neurostimulation

A more complicated but also effective and reliable system is responsive neurostimulation (RNS). This method is composed of a programmable and responsive device that consists of leads, a pulse generator and an external controller. Its functioning is based on the delivery of brief pulses of closed-loop electrical stimulation, to help normalize specific patterns of epileptogenic activity every time they are detected by an algorithm. RNS is an effective and safe adjunctive therapy that, in addition to seizure frequency reduction, may have other applications such as drug-response evaluation and long-term electrocorticography recording [11,12].

More than 2000 patients have likely been treated with RNS since the FDA approved its usage almost 10 years ago [13]. However, regardless of its use, RNS still presents diverse challenges for clinicians.

(iv) Transcranial magnetic stimulation

Although it seems inconsistent, some attempts have been performed through the stimulation at seizure focus, with the aim of hampering the progression of epileptic seizures. Transcranial magnetic stimulation (TMS) is a non-invasive tool for stimulating neural tissue and can be applied in different forms, both for diagnosis and treatment. When TMS is used as therapy, trains of stimuli (repetitive TMS) can modify the cerebral cortex function, both at the stimulated site and quite far from it, involving areas along with functional connections [14]. The advantage of this approach is its invasiveness. Still, this perk is usually counterpoised with the effectiveness of the procedure, which is why it is not widely used in epilepsy.

(v) Transcranial direct current stimulation

In the last year, Transcranial direct current stimulation (tDCS) has emerged as a promising therapeutic tool in diverse fields (addictions, rehabilitation, psychiatry, learning, memory, etc.), deemed a safe and probably effective technique for seizure control in patients with drug-resistant focal epilepsy. In this case, the stimulation is produced by placing the active electrode on the scalp over the pathologically affected region (for example, hippocampus) and the reference electrode, over the contralateral region (supraorbital region) [15]. However, published trials are heterogeneous regarding samples and methodology. Therefore, there is a need for more extensive sham-controlled randomized trials, preferably with mechanistic informed stimulation protocols, to further advance tDCS therapy in the management of epilepsy [16].

(vi) Vagus nerve stimulation

Equally or more important is vagus nerve stimulation (VNS). This method was introduced in humans in 1988 to manage difficult-to-treat epilepsy [17], after which it has been approved for use in many countries worldwide, benefitting more than 100 000 patients. The VNS therapy system is comprised of an electrode connected with a programmable and remote-controlled pulse generator located at the subcutaneous space in the chest wall.

Additionally, VNS has also been proposed as a therapeutic alternative in more than 20 conditions in more recent times. In some of these cases, practical applications have been made. In others, its potential use ranges from treating affections as dissimilar as inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, eating or mood disorders to Alzheimer's disease, migraines or

Parkinson's disease, to name just a few. The methods used to induce VNS can be invasive (surgical implantation of the stimulation system) and non-invasive (transcutaneous stimulation).

Undoubtedly, of all the procedures available to treat refractory epilepsy, VNS is the most widely used for the multiple benefits it offers and for the few adverse effects it has [18]. Although the mechanisms responsible for the amelioration that its use induces are not entirely clear, it is of great interest to continue developing research that allows knowing in depth all the elements that participate in such improvement. Among the various theoretical and practical postulates that support the use of VNS as a tool to reduce the number or intensity of seizures, it might be pointed out that, on the one hand, the stimulus would generate a modification in neuronal polarization, decreasing cortical excitability [19]. On the other hand, there would be an increase in the production of inhibitory neurotransmitters and a decrease in excitatory neurotransmitters. In addition, there is an increase in blood flow to the thalamus bilaterally. Additionally, an immunomodulatory and neuroprotective effect of VNS was recently demonstrated since it produces an increase in the levels of neuroprotective tryptophan metabolites and a decrease in neurotoxic metabolites [20,21].

In drug-resistant epileptic patients, electrical stimulation represents a good, safe and efficient alternative treatment. In addition, some of the varied technical advantages of VNS include reversibility and adjustability. However, contrary to resective procedures, the use of VNS remains palliative. As we pointed out before, VNS is licensed in many countries as an adjunctive therapy. However, most of the other stimulation procedures must be considered experimental, even although several controlled studies are currently under investigation.

(b) Experimental models in epilepsy

The use of experimental models allows us to carry out research on human disorders, which is crucial for the advancement of biomedicine. Currently, there are various experimental models of epilepsy; some require the use of drugs, others are based on electrical stimulation and others are from genetic origin. Each one has its advantages and disadvantages, and its use depends on the objectives of the studies to be performed. Having good experimental models that are also reliable and cost-effective electrical stimulation systems is an essential requirement for in-depth knowledge on the matter and for advancing the development of new therapeutic procedures.

(c) Commercial stimulation devices

The most widely used stimulation method in humans is VNS. Therefore, we will cover the latest advances in VNS devices and their drawbacks when used in experimental models.

Most VNS devices that are implanted surgically can work in an open-loop or closed-loop fashion. Open-loop stimulation refers to devices with preprogrammed parameters, while closed-loop stimulation devices change their parameters dynamically to adapt to the situation of the patient. This parameter adaptation is based in the monitorization of some physiological parameters such as cardiac activity or body position.

Although commercial stimulation devices are effective and safe, their average cost is too high to be used as a research solution in animal experimentation [22]. Also, most of them have a large number of features that complicate the design but are not necessary for experimentation. This excess of features usually implies a large size, not suitable for implantation in smaller organisms such as experimental mice or hamsters.

2. Methods

This section will explain the testing and the basic development techniques that have been used in the research. The initial diagram of the concept is shown in figure 1, used as a starting point for the work.

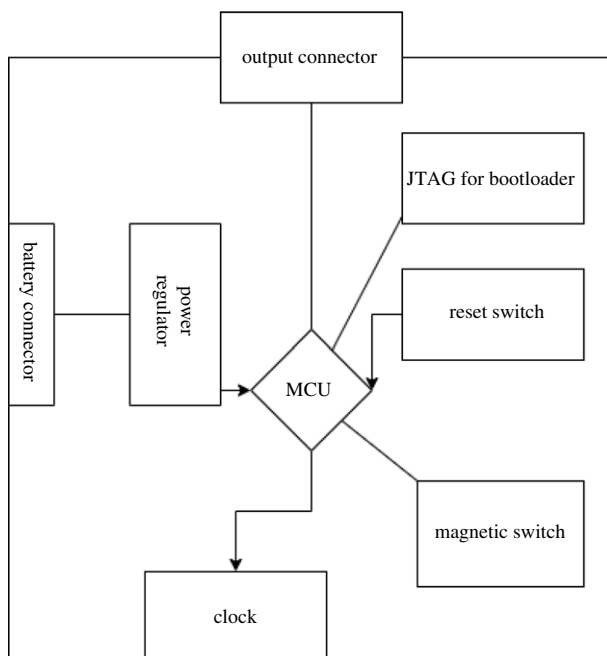


Figure 1. Concept diagram with the intended modules to include in the device as stated in the proposed objectives.

(a) Consumption tests

A DC power supply and a precise multimeter were used to check the consumption of the PCB. It has been verified that when the device is asleep it consumes $10\ \mu\text{A}$ and when operational it consumes $10\ \text{mA}$, being the average consumption of $1\ \text{mA}$. At first, it was thought to use a rechargeable LiPo battery, but for capacities above $500\ \text{mAh}$ the size was too big so was discarded to keep the device small. It was therefore decided to use a $530\ \text{mAh}$ $3.3\ \text{V}$ button cell battery, as it provides the necessary operating voltage for the PCB and provides sufficient power.

After working on optimizing the microcontroller code, an average power consumption of $18.45\ \mu\text{A}$ has finally been achieved. That implies that even the smallest button cell batteries on the market can be used. In our case, it was decided to choose a commercial CR2012 button cell battery of $55\ \text{mAh}$, which provides an autonomy of 372.13 days.

(b) In silico testing

To check that it works correctly, a logic analyser is coupled to the output pin of the device to check whether the board is generating the signal or not. A precise multimeter connected between the battery and the device is used to check the input intensity current flow when the device is asleep or working normally.

(c) In vivo testing

VNS surgery protocol used in the clinic was adapted to the experimental model of epilepsy genetic audiogenic seizure hamster from the University of Salamanca (GASH/Sal) [23]. Traditional VNS in patients requires a surgical intervention, in which a bipolar electrode is placed around the left vagus nerve. This electrode is connected to a pulse generator that is implanted subcutaneously in the chest wall. This surgery is performed by a neurosurgeon and takes approximately 2 hours under general anaesthesia [24].

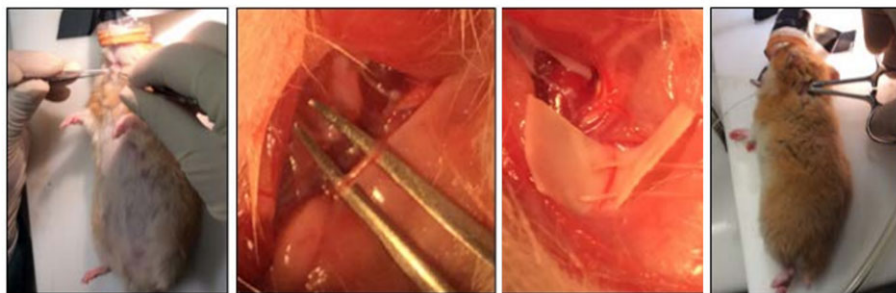


Figure 2. Images of the surgery to implant the electrodes and the device. (Online version in colour.)

VNS surgery shows low risk, although haemorrhages or infections can occur. Thus, most of the side effects of this treatment are mainly associated with the therapy, not due to surgery. Symptoms such as hoarseness, coughing or sore throat are often mild, transient and present only in the ON phase of stimulation. Therefore, these symptoms can usually be controlled by changing stimulation parameters, and their presence decreases over time [25].

Although it is a simple procedure, some technical considerations need to be made regarding electrode placement. Firstly, the cathode is placed cranially, whereas the anode is oriented caudally. This orientation is thought to enhance stimulation of the afferent fibres that project to the brain and block action potentials that travel through the efferent pathway. However, it has been demonstrated that not all these action potentials are blocked. Secondly, VNS is applied to the left vagus nerve in order to avoid adverse cardiovascular side effects since the right vagus nerve has more projections to the cardiac atria. However, stimulation of the right vagus nerve has shown to have an antiepileptogenic effect as well [25].

To mimic clinical settings in our experimental model, surgery was performed under aseptic conditions using inhalation anaesthesia with 4% sevoflurane, 1 L/min O₂ for sedation and 3% sevoflurane 1 L/min O₂ for maintenance (Forane, Abbot Laboratories). Physiological serum was applied periodically to avoid ocular desiccation. Additionally, the use of a thermal blanket prevented heat loss.

For the surgery in animals, first of all, a 1 cm long incision was made in the left anterolateral cervical area to expose the left vagus nerve at the intersection of sternocleidomastoid and sternohyoid muscles and adjacent to the carotid artery. Under the surgical microscope, the vagus nerve was bluntly dissected using gentle opening–closing movements to avoid puncturing blood vessels. Moreover, a sterile micropatch was placed around the cervical vagus for nerve isolation to prevent damaging it and other neighbouring structures during its direct manipulation. This procedure can be seen in figure 2.

Secondly, the animal was placed in prone position, and a small incision was made in the posterior part of the neck in order to implant the neurostimulation device. This procedure enabled the bipolar electrode to be tunnelled to the left anterolateral cervical surgical area and to be placed around the nerve. Next, the electrode was fixed to the nerve by knotting a non-absorbable suture around its case. Finally, both incisions were closed after checking the cuff was encircling the nerve correctly without twisting or pulling and after creating a subcutaneous pocket for the pulse generator in the animal's dorsum.

After surgery, the animals had a recovery period with water and food ad libitum in individual cages and received buprenorphine subcutaneously (0.5 mg/kg) as post-operative analgesia during the first 3 days. Given the size of the hamster vagus nerve, a bipolar electrode was designed for this purpose (MicroProbes For Life Sciences, MD, USA). It is essential to use an appropriately sized electrode to prevent nerve damage and current leakage, which might happen if the electrode placed is too big or too small. Finally, the nerve cuffs consisted of two rings with an inner diameter of 500 µm each, with an individual contact made of 50 µm platinum/iridium wire. Leads were 70 mm long with insulation.

3. Results

(a) Final proposed device

After careful consideration and the evaluation of the different iterations of the designed device the final layout for the prototype was selected to be as in figures 3 and 4.

The main changes introduced after the different versions were the shape (from rectangular to round), the size (reducing it considerably) and the batteries (improving the duration and size by optimizing the code and, therefore, the time that the device is kept awake, which means lower consumption). Also, a three-dimensional printed coating has been prepared to enhance the properties of the device.

(b) Board schematics

The schematics of the PCB can be seen in figure 5.

The first part of the circuit is the microcontroller unit (MCU). This board uses an ATSAM21G18A as the main microprocessor. This microprocessor has been chosen because it allows more flexibility when modifying the timer registers of the MCU and to get a wide range of possible frequencies to the pulse width modulation (PWM) outputs; also, due to the low consumption that it has when it works in sleep mode, it also allows the direct communication between it and a computer by serial port for its programming or the sending and receiving of information without the need of a chip that fulfils the function of the USB interface. This part includes the capacitors and filter coils as well as the crystal with a frequency of 32.7 KHz for running a real time clock (RTC), needed to measure the time correctly.

In the JTAG, there is a five pin connector with a separation of 1.27 mm. It will be used to upload the code to the microcontroller.

Two connectors are included, one that will be for the battery to feed the PCB and another that will be for the probe that carries the signal output.

A magnetic switch has been added to keep the microcontroller in stand-by mode before being inserted into the animal. Once the surgery is done, the doctor approaches a magnet so the switch activates and the device wakes up due to a change of logic level at the magnetic switch input. The sensing range of the Hall sensor is ± 2.0 mT for trip and ± 0.6 mT for release.

(c) Board layout

The distribution of the components on the initial prototype PCB is mainly marked by the size of the PCB and the need to have the connectors in accessible areas.

Although in an initial design both sides of the PCB were used for the capacitors and coils associated with the MCU, in the final version all the components are on the top side of the PCB so the button cell battery can be located in the bottom side.

A circular design is used in the prototype to reduce the edges and facilitate implantation and to ensure that the size of a non-rechargeable button cell battery (20 mm in diameter) can be adapted. The distribution of the components is conditioned firstly by the space, and secondly by the whole circuit to which each component belongs. The power connectors consist of two copper areas, located at the edges of the PCB, where two nickel strips that connect the two poles of the battery (GND and 3 V) are connected.

(d) Code

The way the code will be explained is the following, firstly the bootloader used as well as the libraries used and the global variables, then the set-up, the loop and the two functions associated with the interrupts will be explained.

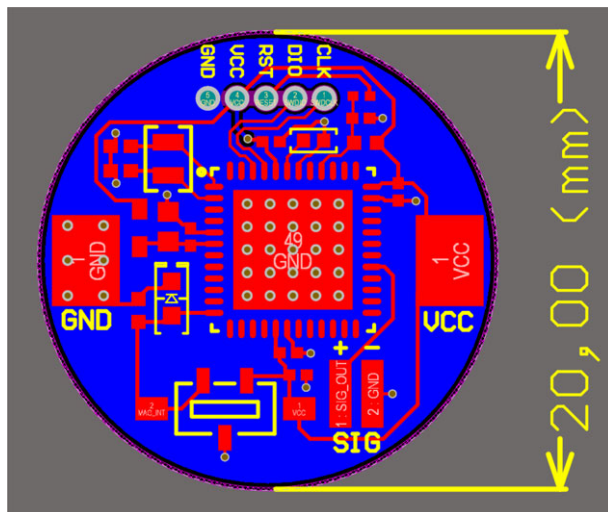


Figure 3. Final layout of the prototype. (Online version in colour.)

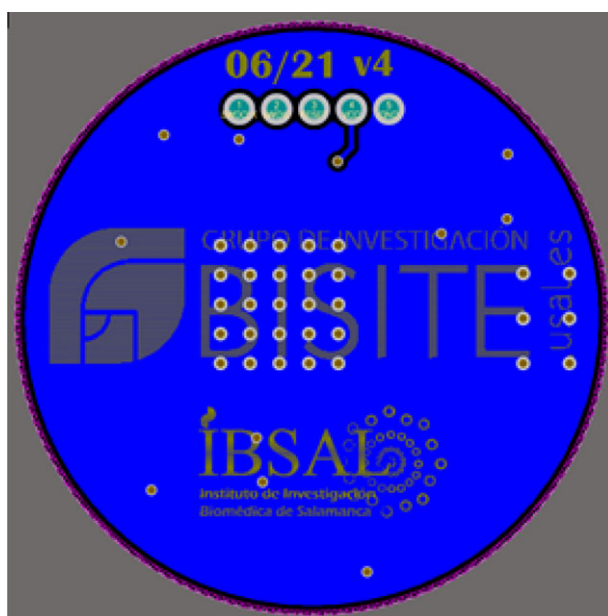
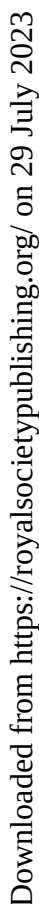


Figure 4. Bottom view of the final prototype. (Online version in colour.)

(i) Set-up

The basic functions of the microcontroller are configured.

- GPIOs: Unused input or output pins are disabled. The pin connected to the magnetic switch is configured as an external interrupt input and the pin connected to the probe is configured as an output.
- PWM: The PWM function, used to induce the electromagnetic pulse in the vagus nerve of the mouse, is set to a frequency of 30 Hz, with a signal high time of 250 ms.



- RTC: The RTC is set to produce two interruptions: one every 30 s and one every 4.30 min. The 4.30 min interrupt is used to wake up the microcontroller and enable the PWM pulse generation and start the 30 s counter. The 30 s interrupt is used to disable the PWM signal and induce the microcontroller in a low power state (stand-by).

(ii) Loop

This loop starts once the external interrupt has been triggered, which means that the surgery has been completed and the doctor has brought a magnet close to the device. The PWM signal is then enabled, the 30 s counter is enabled and the device enters the low-power stand-by state. Thanks to the composition of the SAMD21 microcontroller, the microcontroller will be able to continue generating the signal even in a low power state. Once the 30 s have elapsed, the PWM signal generation function is disabled, the 4.30 min counter is started and the microcontroller is induced into a low power state. The loop will repeat after this time.

(e) In silico test results

(i) Consumption test

(ii) Stability testing

The correct working process of the device was tested prior to implantation as explained in §b.

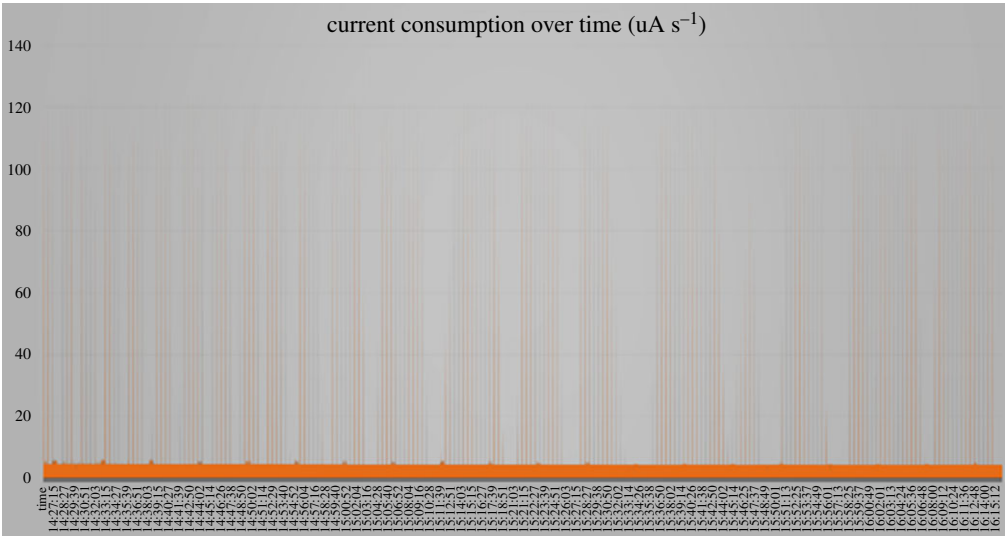


Figure 6. Current consumption during working and sleep cycles. (Online version in colour.)

Table 1. PWM parameters in a 10 min run

parameter	value
N_{falling}	854
N_{rising}	854
f_{min}	30.3876 Hz
f_{max}	30.4112 Hz
f_{mean}	30.3998 Hz
$N_{p(+)}$	854
$N_{p(-)}$	854
D_{cycle}	752.4778 m%

The consumption readouts in the different test range from $4.4\mu\text{A}$ when in sleep mode to $8.73\mu\text{A}$ when working.

In figure 6, a test run of 10 min is shown to evaluate the stability of the system.

(f) *In vivo* test results

Following the procedure described above, we implanted our designed VNS system in 32 GASH/Sal for 14 days to carry out diverse experiments to study the mechanisms of action of VNS. We evaluated the presence and magnitude of the seizures before the surgery and then again 7, 10 and 14 days after the implantation of the PCB.

The animals were exposed to white noise (0–108 kHz and 115–120 dB) until the tonic-colonic seizure appeared (or during a minute maximum). The animal’s behaviour was recorded and used later for the neuroethological study by means of the Ethomatic software. The severity of the seizures was evaluated using the level Seizure Index.

At the end of the experiments, all the animals showed the total abolition of tonic-clonic seizures. Although a few of them retained wild running behaviour at the beginning of the stimulation, the Seizure Index was less than or equal to 3 (which is a very low index).

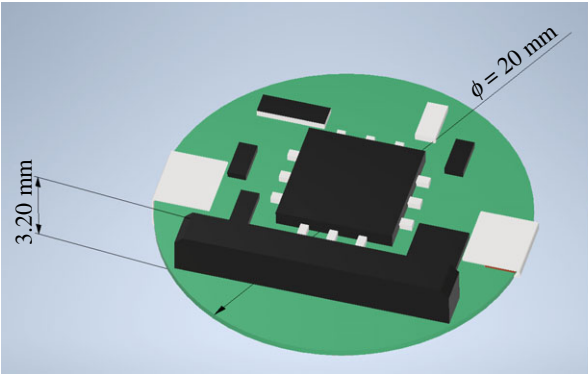


Figure 7. Rendering of the device with the button cell battery installed and photograph of the encapsulated device (without the cap installed). (Online version in colour.)

Table 2. Size comparison between commercial VNS devices and the developed prototype; all measurements are in millimetres.

prototype	SenTiva Duo™ M1000-D	AspireSR® M106	Demipulse® Duo M104
20 × 20 × 3.2	45 × 39 × 6.9	52 × 52 × 6.9	45 × 39 × 6.3

The neuroethological results obtained using our own VNS system are similar to those obtained with the use of a commercial device (VNS Therapy, Demipulse Duo, Model 104 Generator, Livanova) designed for clinical use. No adverse effects were observed in any of the animals studied.

4. Conclusion

In comparison with the average price of a VNS device, we have achieved a final cost of 150€ each device. This allows for a really affordable VNS system for animal experimentation and a great reduction of cost compared with the commercial versions available.

Also, the newly designed device represents a fraction of the size of a commercial VNS stimulator (table 2), making it easier to be surgically implanted and reducing the drawbacks of the surgery. To our knowledge, this is the first VNS device developed specifically for its use in rodents and animal experimentation. Moreover, the capsule made with BiomedClean resin (FormLabs) designed for the device allows for easy access to the electronics before the surgery and for repairs to be made in case these are deemed necessary.

The size differences can be attributed to the difference in battery life between the commercial VNS devices and the developed prototype. Since animal experimentation does not require the devices to run during the whole lifespan of the animal the battery life can be severely reduced from the usual 5–10 years in a commercial device to a year in the case of the prototype.

The final version of the device with the encapsulation (and the rendering of the electronics) can be seen in figure 7.

The design of the device has thus far exceeded the expectations that were originally set when the work began. The high efficacy in controlling epileptic seizures and the low price of the device have been a great success. However, there is still room for improvement in the device in two main areas: insulation and coating, and long-term performance.

Future developments should consider the implementation of certain features of commercial devices such as remote programming or modification of parameters once the device has been implanted. Furthermore, in the field of insulation, biocompatible materials should be sought that reduce the immunological response to foreign bodies.

Ethics. All animals were housed, manipulated and sacrificed in accordance with current European (2010/63/EU, Recommendation 2007/526/CE) and Spanish Legislation (Law 32/2007, RD 53/2013). The project received authorization by the Bioethics Committee of the university with number 327.

Data accessibility. This article has no additional data.

Authors' contributions. J.H.-S., S.M.-S., A.C.-A. and R.C.-V. designed the device. J.H.-S. and S.M.-S. built the prototypes. J.G., O.C. and J.M.G. performed the experimental procedures and the surgeries. J.M.C. and O.C. conceived the study. A.C.-A., O.C., J.M.G. and J.M.C. drafted the manuscript. All authors read and approved the manuscript. A.C.-A.: methodology, writing—original draft, writing—review and editing; J.H.-S.: conceptualization, data curation, methodology, validation, writing—review and editing; R.C.-V.: investigation, project administration, supervision, validation, writing—review and editing; O.C.: conceptualization, funding acquisition, investigation, methodology, project administration, resources, writing—original draft, writing—review and editing; J.M.G.: conceptualization, methodology, supervision, validation, writing—original draft, writing—review and editing; S.M.-S.: data curation, methodology, software, writing—review and editing; J.M.G.: conceptualization, investigation, supervision, validation, writing—original draft, writing—review and editing; J.M.C.: conceptualization, funding acquisition, project administration, supervision, validation, writing—review and editing.

All authors gave final approval for publication and agreed to be held accountable for the work performed therein.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Funding. This work was supported by the HERMES project, funded by the European Union under the Horizon 2020 FET-proactive program, grant agreement no. 824164 and Gerencia Regional de Salud de la Junta de Castilla y León grant nos. (1600/A/17, 1838/A/18, 2060/A/19, 2158/A/20). J.G. was in receipt of an FPU grant from the Spanish Government (FPU 18/04070).

Acknowledgements. The authors thank Marcel Vicente Muñoz, our electronic technician, for his help in assembling and designing the final version of the studio prototypes as well as for his meticulous work on all the projects in which he has participated.

References

1. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. 2019 Epilepsy in adults. *Lancet* **393**, 689–701. (doi:10.1016/S0140-6736(18)32596-0)
2. Fisher RS, Velasco AL. 2014 Electrical brain stimulation for epilepsy. *Nat. Rev. Neurol.* **10**, 261–270. (doi:10.1038/nrneurol.2014.59)
3. Kalilani L, Sun X, Pelgrims B, Noack-Rink M, Villanueva V. 2018 The epidemiology of drug-resistant epilepsy: a systematic review and meta-analysis. *Epilepsia* **59**, 2179–93. (doi:10.1111/epi.14596)
4. Rugg-Gunn F, Miserocchi A, McEvoy A. 2020 Epilepsy surgery. *Pract. Neurol.* **20**, 4–14. (doi:10.1136/practneurol-2019-002192)
5. Salanova V. 2018 Deep brain stimulation for epilepsy. *Epilepsy & Behav.* **88**, 21–24. (doi:10.1016/j.yebeh.2018.06.041)
6. Starnes K, Miller K, Wong-Kissel L, Lundstrom BN. 2019 A review of neurostimulation for epilepsy in pediatrics. *Brain Sci.* **9**, 283. (doi:10.3390/brainsci9100283)
7. Patel SH, Halpern CH, Shepherd TM, Timpone VM. 2017 Electrical stimulation and monitoring devices of the CNS: an imaging review. *J. Neuroradiol.* **44**, 175–184. (doi:10.1016/j.neurad.2016.12.005)
8. Kaczmarczyk R, Tejera D, Simon BJ, Heneka MT. 2018 Microglia modulation through external vagus nerve stimulation in a murine model of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **146**, 76–85. (doi:10.1111/jnc.14284)
9. Chang CW, Lee ST, Lim SN, Cheng MY, Lee CY, Wu T. 2019 Electrical cortical stimulation for refractory focal epilepsy: a long-term follow-up study. *Epilepsy Res.* **151**, 24–30. (doi:10.1016/j.eplepsyres.2019.01.003)
10. Vassileva A, van Blijoijs D, Leijten F, Huiskamp G. 2018 Neocortical electrical stimulation for epilepsy: closed-loop versus open-loop. *Epilepsy Res.* **141**, 95–101. (doi:10.1016/j.eplepsyres.2018.02.010)
11. Jarosiewicz B, Morrell M. 2021 The RNS System: brain-responsive neurostimulation for the treatment of epilepsy. *Expert Rev. Med. Devices* **18**, 129–138. (doi:10.1080/17434440.2019.1683445)

12. Matias CM, Sharan A, Wu C. 2019 Responsive neurostimulation for the treatment of epilepsy. *Neurosurg. Clin. N Am.* **30**, 231–242. (doi:10.1016/j.nec.2018.12.006)
13. Loring DW, Jarosiewicz B, Meador KJ, Kanner AM, Skarpaas TL, Morrell MJ. 2021 Mood and quality of life in patients treated with brain-responsive neurostimulation: the value of earlier intervention. *Epilepsy & Behav.* **117**, 107868. (doi:10.1016/j.yebeh.2021.107868)
14. Lefaucheur JP *et al.* 2014 Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS). *Clin. Neurophysiol.* **125**, 2150–2206. (doi:10.1016/j.clinph.2014.05.021)
15. Tekturk P *et al.* 2016 The effect of transcranial direct current stimulation on seizure frequency of patients with mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **149**, 27–32. (doi:10.1016/j.clineuro.2016.07.014)
16. Sudbrack-Oliveira P, Barbosa MZ, Thome-Souza S, Razza LB, Gallucci-Neto J, Valiengo LD, Brunoni AR. 2021 Transcranial direct current stimulation (tDCS) in the management of epilepsy: a systematic review. *Seizure* **86**, 85–95. (doi:10.1016/j.seizure.2021.01.020)
17. Uthman BM, Wilder BJ, Penry JK, Dean C, Ramsay RE, Reid SA, Hammond EJ, Tarver WB, Wernicke JF. 1993 Treatment of epilepsy by stimulation of the vagus nerve. *Neurology* **43**, 1338–1345. (doi:10.1212/WNL.43.7.1338)
18. Toffa DH, Touma L, El Mesquine T, Bouthillier A, Nguyen DK. 2020 Learnings from 30 years of reported efficacy and safety of vagus nerve stimulation (VNS) for epilepsy treatment: a critical review. *Seizure* **83**, 104–123. (doi:10.1016/j.seizure.2020.09.027)
19. Hulsey DR, Riley JR, Loerwald KW, Rennaker II RL, Kilgard MP, Hays SA. 2017 Parametric characterization of neural activity in the locus coeruleus in response to vagus nerve stimulation. *Exp. Neurol.* **289**, 21–30. (doi:10.1016/j.expneurol.2016.12.005)
20. Mertens A, Raedt R, Gadeyne S, Carrette E, Boon P, Vonck K. 2018 Recent advances in devices for vagus nerve stimulation. *Expert Rev. Med. Devices* **15**, 527–539. (doi:10.1080/17434440.2018.1507732)
21. Parastarfeizabadi M, Kouzani AZ. 2017 Advances in closed-loop deep brain stimulation devices. *J. Neuroeng. Rehabil.* **14**, 1–20. (doi:10.1186/s12984-017-0295-1)
22. Ben-Menachem E, Hellström K, Verstappen D. 2002 Analysis of direct hospital costs before and 18 months after treatment with vagus nerve stimulation therapy in 43 patients. *Neurology* **59**(6 Suppl. 4), S44–S47. (doi:10.1212/WNL.59.6_suppl_4.S44)
23. Muñoz LJ, Carballosa-Gautam MM, Yanowsky K, García-Atarés N, López DE. 2017 The genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca: the GASH: Sal. *Epilepsy & Behav.* **71**, 181–192. (doi:10.1016/j.yebeh.2016.03.002)
24. García-March G, Sánchez-Ledesma MJ, Broseta J. 2008 Estimulación eléctrica vagal en el tratamiento de la epilepsia rebelde. *Situación actual. Neurocirugía* **19**, 416–426. (doi:10.1016/s1130-1473(08)70208-2)
25. Noller CM, Levine YA, Urakov TM, Aronson JP, Nash MS. 2019 Vagus nerve stimulation in rodent models: an overview of technical considerations. *Front. Neurosci.* **13**, 911. (doi:10.3389/fnins.2019.00911)