

---

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Y AGROPECUARIAS

---



**Caracterización de las crisis epileptiformes inducidas  
por 4-aminopiridina durante el desarrollo postnatal temprano  
de la rata.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**P R E S E N T A**

**CAROL MAYARI GUTIÉRREZ REYES**

**Las Agujas, Zapopan, Jal., Mayo de 2011.**



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y**  
**Agropecuarias**

*Coordinación de carrera de Licenciado en Biología*

**C. CAROL MAYARI GUTIÉRREZ REYES**  
**PRESENTE**

Manifiestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: **"CARACTERIZACIÓN DE LAS CRISIS EPILEPTIFORMES INDUCIDAS POR 4-AMINOPYRIDINA DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL TEMPRANO DE LA RATA"** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo la **Dra. Mónica E. Ureña Guerrero**.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"PIENSA Y TRABAJA",**  
**"2009, Año del Bicentenario de Charles Darwin"**  
Las Agujas, Zapopan, Jal., 11 de junio de 2009.

  
**DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA,**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

  
**BIOL. MARGARITO MORA NÚÑEZ**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS  
 PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN  
 LICENCIATURA EN BIOLOGÍA  
 CUCBA, UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
 PRESENTE

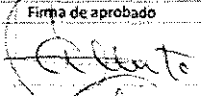



Por este conducto, nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad TESIS E INFORMES, opción TESIS con el título: "CARACTERIZACIÓN DE LAS CRISIS EPILEPTIFORMES INDUCIDAS POR 4-AMINOPYRIDINA DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL TEMPRANO DE LA RATA" que realizó la pasante C. CAROL MAYARI GUTIÉRREZ REYES con número de código 397246041 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

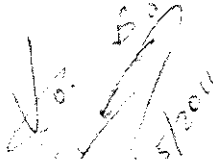
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, 13 de abril de 2011.

  
 Dra. Mónica Elisa Ureña Guerrero  
 Directora del Trabajo

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Alberto Morales Villograán		Mayo 3, 2011
Gracelo Gutierrez		3 Mayo 2011
Vacante Daniela Pineda Suplente		4 Mayo 2011
Alfredo I. Feria Velasco		Mayo 3, 2011

  
 No. 5/2011

Este trabajo se realizó inicialmente en el Laboratorio de Neuroquímica y Neurofisiología y posteriormente, en el Laboratorio de Neurobiología Celular, ambos pertenecientes al Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de Guadalajara, bajo la dirección de la Dra. Mónica Elisa Ureña Guerrero.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) que a través de los Recursos para Investigación asignados al Proyecto PROMEP-EXB-UDG-515 favoreció la realización de este trabajo, además de otorgarme apoyo económico durante la realización de este trabajo, bajo el número de contrato 2656890.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Jalisco (COECYTJAL) que a través de los recursos asignados al Proyecto COECYTJAL-UDG-06-2009-926 favoreció la realización de este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a la Dra. Mónica Elisa Ureña Guerrero por todo el apoyo que me ha brindado, y por la dirección rigurosa de este trabajo.

Así mismo, agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Neurobiología Celular por su apoyo personal y humano.

A mi esposo Julián Darío y a mi hija Katherine Alondra, porque son parte importante de mí.

Gracias a mi familia, a mis padres por todo el cariño y el apoyo moral que siempre he recibido de ustedes y con el cual he logrado culminar mi esfuerzo, terminando así mi carrera profesional.

A mi amiga, que me ha apoyado siempre, la Biol. Karla J. Martín del Campo Ruíz.

Y a todos, los que de alguna forma han contribuido en mi formación.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AP	Anteroposterior
Ala	Alanina
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol-4-propionato
ANOVA	Análisis de varianza
Asp	Aspartato o ácido aspártico
Ca <sup>++</sup>	Ión calcio
CA1, CA2, CA3	Campos de Ammon o <i>Cornus Ammonis</i>
CCG	Convulsión clónico generalizada
CTCG	Convulsión tónico-clónico generalizada
Cl <sup>-</sup>	Ión cloro
4AP	4-aminopiridina
DEPN	Días de edad postnatales
EEG	Electroencefalográfico
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GABA <sub>A</sub>	Receptores de GABA tipo A
GABA <sub>B</sub>	Receptores de GABA tipo B
GABA-T	4-aminobutirato-2-oxoglutarato-aminotransferasa
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
GAT	Transportadores de GABA
Gln	Glutamina
Glu	Ácido Glutámico
GLUR1-4	Subunidades del R-AMPA
GLUR5-7	Subunidades del R-KA
Gly	Glicina
Hp	Hipocampo
I <sub>A</sub>	Corriente de potasio tipo A
i.c.	Intracerebral
I <sub>D</sub>	Corriente de potasio de inactivación lenta tipo D

i.p.	Intraperitoneal
IP3	1,4,5-inositol trifosfato
K <sup>+</sup>	Ión Potasio
KA	Ácido kaínico o kainato
KCC2	Co-transportador K <sup>+</sup> -Cl <sup>-</sup>
L	Lateral
M1-4	Dominios transmembranales de las subunidades de los receptores ionotrópicos a Glu
m-GluR1-8	Receptores metabotrópicos a Glu tipo 1-8
μl	Microlitro
mM	Milimolar
μV	Microvolts
Na <sup>+</sup>	Ión Sodio
NKCC1	Co-transportador Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup>
NMDA	N-metil-D-aspartato
NR1, NR2A-D	Subtipos de subunidades del receptor tipo NMDA
R-AMPA	Receptor glutamatérgico tipo AMPA
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNCm	Sistema Nervioso Central de mamíferos
Thr	Treonina
V	Ventral
vGAT	Transportador vesicular de GABA
vGlu	Transportador vesicular de Glutamato



## RESUMEN

Durante el desarrollo temprano del sistema nervioso (SN), existen condiciones electroquímicas propias, que lo hacen hiperexcitable y por lo tanto, más susceptible a la generación de crisis epileptiformes. Dentro de esas condiciones, se encuentra la excitación neuronal mediada por GABA, efecto que se transforma a lo largo del desarrollo, para originar inhibición neuronal. Tanto la excitación como la inhibición mediadas por GABA, dependen de la activación del receptor GABA<sub>A</sub>, un complejo pentamérico que al activarse permite la difusión facilitada del ión cloruro (Cl<sup>-</sup>). La salida del Cl<sup>-</sup> despolariza la membrana neuronal, en tanto que su entrada, la hiperpolariza, favoreciendo o retrasando la generación del potencial de acción, respectivamente. Así, los efectos del GABA, dependen del gradiente electroquímico del Cl<sup>-</sup> y por lo tanto, de los sistemas de transporte que lo regulan, los cuales a nivel neuronal son fundamentalmente dos, el importador de Cl<sup>-</sup>, conocido como NKCC1, cuyo nivel de expresión es significativamente mayor en etapas tempranas del desarrollo; y el exportador de Cl<sup>-</sup>, conocido como KCC2, el cual se expresa posteriormente durante el desarrollo. Dado que la expresión de KCC2 en el SN, se da exclusivamente a nivel neuronal, se considera determinante para la modificación del efecto excitador al efecto inhibitor del GABA típico del adulto. Así, se ha reportado que el pico máximo de expresión de KCC2 en el hipocampo de rata se presenta al día de edad postnatal (DEPN) 9. Sin embargo, estudios *in vitro*, proponen el GABA deja de ejercer su efecto excitador entre el DEPN 7 y el 15; y estudios *in vivo* proponen que la susceptibilidad convulsiva es mayor entre el DEPN 10 y el 13. Por todo lo anterior, en el presente trabajo se caracterizaron las modificaciones conductuales y electroencefalográficas (EEG) inducidas por el convulsionante 4AP, al administrarse sistémicamente en ratas, durante los primeros quince días del desarrollo postnatal. Para tal efecto, primero se caracterizaron las alteraciones conductuales inducidas por la administración de 0.5, 1, 2 y 4 mg de 4AP/kg de peso corporal, por vía subcutánea, los DEPN 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15. Posteriormente se evaluaron las alteraciones en la actividad EEG, inducidas por la administración de 2 mg de 4AP/kg de peso corporal, por vía subcutánea, los DEPN 3, 7, 11 y 15. Los resultados muestran que todas las dosis de 4AP y en todas las edades estudiadas inducen hiperexcitabilidad motora, asociada a saltos y clonos de las extremidades delanteras que evolucionan hacia

convulsiones clónicas generalizadas (CCG) leves (sin pérdida de la postura). Las dosis de 1, 2 y 4 mg 4AP indujeron además, CCG severas (con pérdida de la postura) y convulsiones tónico-clónico generalizadas (CTCG) en los DEPN 5, 7, 9 y 11. En edades posteriores, estas conductas solo fueron observadas con las dosis de 2 y 4 mg de 4AP. La mayor incidencia de CTCG y muertes asociadas a las convulsiones, por número de animales que las presentaron, se observó en el DEPN 11. En cuanto a la actividad EEG, se registraron la administración sistémica de 2 mg de 4AP/kg peso corporal que fue capaz de inducir descargas epileptiformes tipo ráfaga después de la aparición de las CTCG, en animales de 7, 11 y 15 DEPN. La amplitud neta de la actividad EEG basal se incremento significativamente con la edad de los animales. El cambio en amplitud neta observado por la administración de 4AP, fue significativamente mayor a partir del minuto 30, y particularmente mayor en los DEPN 11 y 15, edades en las cuales, la latencia de aparición de la primera ráfaga de descargas epileptiformes fue significativamente menor en comparación con el DEPN 7. Todos estos resultados indican que la severidad de las crisis inducidas por la administración sistémica de 4AP, se eleva significativamente después del DEPN 7 y empieza a disminuir alrededor del DEPN 13; y que de acuerdo a la incidencia de CTCG y muerte, la edad de mayor susceptibilidad a estas convulsiones, corresponde al DEPN11, lo cual aunque no coincide exactamente con el pico de expresión de NKCC1 observado en el hipocampo de rata, sí lo hace con el de la corteza entorrinal, y probablemente con el de otras regiones del SN central aún no estudiadas. De esta forma, los resultados sugieren que la mayor susceptibilidad convulsiva del neonato, podría estar relacionada al menos en parte, con el efecto excitador del GABA y que por lo tanto, los anticonvulsivos usados en el adulto que potencian el efecto del GABA para controlar las crisis, podrían no ser la mejor opción para el manejo de las crisis neonatales.

# ÍNDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Lista de abreviaturas	v
Resumen	vii
Introducción	1
Antecedentes	3
Clasificación de las epilepsias	4
Características generales de las epilepsias neonatales	5
Modelos experimentales de epilepsia	7
Sistemas de neurotransmisión que participan en la epilepsia	10
Susceptibilidad convulsiva en etapas tempranas del desarrollo del Sistema Nervioso	19
Planteamiento del Problema	24
Hipótesis	25
Objetivos	26
Materiales y Métodos	27
Evaluación de las alteraciones sobre la conducta motora	27
Evaluación de las alteraciones sobre la actividad Electroencefalográfica	28
Diagrama Experimental	31
Resultados	32
Alteraciones en la conducta motora inducidas por 4AP	32
Alteraciones en la actividad electroencefalográfica inducidas por 4AP	37
Discusión	42
Conclusiones	46
Literatura Citada	47

# INTRODUCCIÓN

La función normal del sistema nervioso se basa en el equilibrio dinámico existente entre los diferentes sistemas de neurotransmisión, donde la pérdida de este equilibrio, puede conducir a diversas alteraciones, entre las que se encuentra la generación de crisis epileptiformes. Alteración neurológica que es más frecuente en la etapa neonatal (Fragoso-Veloz et al., 1990) y que puede volverse espontáneamente recurrente e impredecible, hasta generar un síndrome epiléptico (Rubio-Donnadieu, 1997; Dias-Silva, 2002). El establecimiento de la epilepsia puede implicar a diferentes regiones cerebrales, así como alteraciones en prácticamente todos los sistemas de neurotransmisión (Fisher, 1984). Sin embargo, se conoce que la disminución del umbral de excitación favorece la generación de las crisis epilépticas, condición que puede presentarse tanto por un exceso de excitación, como por una deficiencia en la inhibición (Dichter, 1998).

Durante el desarrollo embrionario y en los primeros días posteriores al nacimiento, los dos neurotransmisores más abundantes del sistema nervioso central de mamíferos (SNCm): el ácido glutámico (Glu) y el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA); producen excitación neuronal (Ben-Ari, 2001 y 2006). Sin embargo, en la etapa adulta, el GABA tiene efectos inhibidores y controla el umbral de excitación neuronal (Rogawski y Losher, 2004). Así, la mayoría de las evidencias experimentales proponen, que la excitación mediada por GABA es determinante para aumentar la propensión a generar crisis epileptiformes, ya sea en la etapa neonatal o en diferentes condiciones patológicas (Ben-Ari, 2002; Bragin et al., 2009). Tanto el efecto excitador como el efecto inhibidor del GABA, implican la activación del receptor GABA<sub>A</sub> (R-GABA<sub>A</sub>) (Ben-Ari, 2002), el cual es un receptor ionotrópico que facilita la difusión del ión cloruro (Cl<sup>-</sup>) a través de la membrana (Bormann, 1988). Al entrar Cl<sup>-</sup> a la neurona, la membrana se hiperpolariza y se disminuyen las posibilidades de generar un

potencial de acción. En cambio, la salida de  $\text{Cl}^-$  despolariza la membrana neuronal y eleva las posibilidades de generar un potencial de acción (Ben-Ari, 2002). Así, los efectos del GABA, dependen del gradiente electroquímico del  $\text{Cl}^-$  y por lo tanto, de los sistemas de transporte que lo regulan, los cuales a nivel neuronal son fundamentalmente dos, el importador de  $\text{Cl}^-$ , conocido como NKCC1 (Delpire y Mount, 2002), cuyo nivel de expresión es significativamente mayor en etapas tempranas del desarrollo (Dzhala et al., 2005); y el exportador de  $\text{Cl}^-$ , conocido como KCC2 (Ben-Ari, 2006), el cual se expresa posteriormente durante el desarrollo (Dzhala et al., 2005). Dado que la expresión de KCC2 en el SN, se da exclusivamente a nivel neuronal, se considera determinante para la modificación del efecto excitador al efecto inhibitor del GABA típico del adulto (Ben-Ari, 2006). Así, se ha reportado que el pico máximo de expresión de KCC2 en el hipocampo de rata se presenta al día de edad postnatal (DEPN) 9 (Dzhala et al., 2005). Sin embargo, estudios *in vitro*, proponen que el GABA deja de ejercer su efecto excitador entre el DEPN 7 y el 15 (Ben-Ari, 2001); y estudios *in vivo* proponen que la susceptibilidad convulsiva es mayor entre el DEPN 10 y el 13 (Mares, 2009). Por todo lo anterior, en el presente trabajo se caracterizaron las modificaciones conductuales y electroencefalográficas (EEG) inducidas por el convulsionante 4AP, al administrarse sistémicamente en ratas, durante los primeros quince días del desarrollo postnatal.

## ANTECEDENTES

La epilepsia se define como un padecimiento crónico que se caracteriza por la aparición recurrente y espontánea de crisis convulsivas y no-convulsivas, las cuales se generan cuando un grupo de neuronas cerebrales descargan de forma repentina, excesiva e hipsincrónica; que conduce a la aparición de alteraciones cognitivas, motoras, sensoriales, autonómicas o psicológicas identificables ([www.ilae-epilepsy.org](http://www.ilae-epilepsy.org)).

Los factores causales de la epilepsia varían de acuerdo a la edad y debe considerarse que no todas las crisis convulsivas son epilepsia, ya que existen condiciones o etapas de algunas enfermedades que cursan como parte de su sintomatología por convulsiones, las cuales una vez que se ha resuelto el problema subyacente o se ha controlado la enfermedad, no vuelven a presentarse. En este gran grupo de condiciones se encuentran las crisis febriles de la infancia, las convulsiones por privación de sustancias como el alcohol, las benzodiacepinas y otras drogas; las convulsiones por trastornos metabólicos que cursan por hipocalcemia e hipoglucemia, entre otros (Feria-Velasco et al., 1997; Litt et al., 2001; Yusta, 2005)

Entre los factores causales más comunes, que se asocian a la epilepsia humana se encuentran los siguientes:

- Alteraciones en el desarrollo prenatal
- Alteraciones en el desarrollo perinatal
- Alteraciones vasculares del sistema nervioso central
- Traumatismo craneoencefálico
- Procesos inflamatorios e infecciosos del sistema nervioso central
- Alteraciones cicatriciales y regenerativas
- Procesos neurodegenerativos
- Tumores del sistema nervioso central
- Otras causas (Feria-Velasco et al., 2010)

## CLASIFICACIÓN DE LAS EPILEPSIAS

Las epilepsias pueden clasificarse de acuerdo al agente etiológico, en: sintomáticas, criptogénicas o idiopáticas; y de acuerdo al sitio donde se localizan las descargas eléctricas cerebrales que las originan, en: parciales o generalizadas. En las epilepsias parciales, no siempre existe pérdida de la conciencia y las descargas epileptiformes se limitan a una zona dentro de uno de los hemisferios cerebrales. En las epilepsias generalizadas, ambos hemisferios cerebrales se encuentran afectados y la pérdida de la conciencia y el control motor son comunes. Las crisis pueden generalizarse desde su inicio (primariamente generalizadas) o después de una crisis parcial (secundariamente generalizadas). Además, la clasificación de la epilepsia no sólo se basa en los criterios mencionados, sino que también puede tomar en cuenta la patología con la que se asocia, la edad en que se presenta, las manifestaciones clínicas de las crisis, las características electroencefalográficas y hasta el pronóstico (Rubio-Donnadieu,1997; Dias-Silva, 2002; Ekman y Forsgren, 2004).

El *status epilepticus* se refiere a la persistencia de una crisis o de una serie de crisis, durante las cuales el individuo no recupera completamente la conciencia. El parámetro de duración para distinguir el *status epilepticus* de una crisis es controversial aún. Actualmente, hay un acuerdo en la literatura que distingue dos definiciones de *status epilepticus*: 1) de acuerdo con la duración, se refiere a una crisis persistente durante más de 30 minutos o varias crisis recurrentes en un periodo de 30 minutos sin recuperar la conciencia; y 2) de acuerdo con la severidad, se refiere al *status epilepticus* tónico-clónico, el cual es claramente identificable y tiene un manejo terapéutico inmediato (Dupon y Crespel, 2009).

## CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS EPILEPSIAS NEONATALES

En el neonato, existe un amplio rango de desórdenes sistémicos y nerviosos que aumentan el riesgo a convulsionar. En infantes prematuros de menos de 30 semanas de gestación, la incidencia de crisis epileptiformes es alta y se presenta hasta en un 3.9% de estos neonatos, comparado con el 1.5% de lactantes mayores (Scher et al., 1993). La causa más común de convulsión sintomática neonatal es la encefalopatía isquémica-hipóxica, la cual afecta aproximadamente a 1-2 de 1000 nacidos vivos (Ronen et al., 1999; Saliba et al., 1999) (Cuadro 1). Las convulsiones por esta causa ocurren de 1-2 días después del nacimiento o bien, a los pocos días después. Sin embargo, existe un riesgo elevado de que evolucionen hacia un síndrome epiléptico a largo plazo y de que desarrollen déficits cognoscitivos y neurológicos severos (Ronen et al., 2007; Bergamasco et al., 1984). El *status epilepticus* en niños precede a la epilepsia en un 30-75% (Maytal et al., 1989; Aicardi y Chevrie, 1970). Cuando existe evidencia de un compromiso cerebral, con malformación (Sisodiya, 2004) o parálisis cerebral (Gururaj, 2003) es más probable que el *status epilepticus* ocurra en la infancia, que en la adultez. En esos casos, el establecimiento del *status epilepticus* indica un pobre control de las crisis, y aunque no se les considere como el agente causal determinante (Sillanpaa, 1993), se conoce que un cerebro comprometido puede favorecer el curso de la epilepsia (Shorvon, 2002).

Por otro parte, en el neonato, el estado mínimo relativo de mielinización de estructuras corticales y subcorticales y la falta de madurez en la interconectividad regional, incluyendo tanto la hemisférica como la córtico-espinal, provoca que las manifestaciones conductuales de las convulsiones neonatales sean modestas (Haynes et al., 2005; Takashima et al., 1980), lo que dificulta su diagnóstico, ya que con frecuencia las convulsiones no se correlacionan clínicamente con alteraciones electroencefalográficas, a este fenómeno se le llama “disociación electro-clínica” (Jensen, 2009). Aunque hay datos significativos que demuestran que las manifestaciones clínicas de las



crisis pediátricas y neonatales difieren de lo observado en los adultos, tanto en humanos como en animales; las manifestaciones electroencefalográficas del *status epilepticus* en el cerebro en desarrollo no han sido bien estudiadas (Moshe, 2000). Los patrones convulsivos tónico-clónicos organizados, característicos del adulto, no se observan en el neonato debido primordialmente a la inmadurez del SNC. Los estudios experimentales de epilepsia, sugieren que las etapas del *status epilepticus* en un electroencefalograma, pueden diferir con la edad, por lo que necesita ser investigado en las diferentes etapas del desarrollo (Jensen, 2009).

---

---

**Cuadro 1. Diversos Tipos de Etiologías de las Crisis Neonatales.**

---

---

**Desórdenes Metabólicos Agudos**

- Hipoglucemia
- Hipocalcemia
- Hipomagnesemia
- Hipo o hipernatremia
- Síndromes de abstinencia por el consumo materno de drogas
- Iatrogenia asociada con la administración fetal inadvertida de anestésicos locales
- Errores innatos del metabolismo poco frecuentes (incluyen respuesta a la piridoxina)

**Desórdenes Cerebro-vasculares**

- Encefalopatía hipoxi-isquémica
- Accidente cerebro-vascular isquémico arterial y venoso
- Hemorragia intracerebral
- Hemorragia sub-dural
- Hemorragia sub-aracnoidea

**Infecciones a nivel del SNC**

- Meningitis bacterial
- Meningoencefalitis viral
- Infecciones intrauterinas

**Trastornos del desarrollo**

- Múltiples formas de disgenesia cerebral

**Otros**

- Desórdenes genéticos raros
  - Convulsiones neonatales benignas familiares (Mutaciones en canales iónicos de sodio y potasio)
  - Encefalopatía mioclónica temprana
- 
- 

Elaborado con base en Jensen, 2009.

## MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA

El conjunto de conocimientos en torno a los mecanismos básicos que participan en un evento epiléptico y la caracterización de las terapias con fármacos anticonvulsivos han sido posibles a través del estudio de diferentes modelos experimentales de epilepsia. En dichos modelos, se han seleccionado especies de mamíferos que presentan manifestaciones electroencefalográficas y conductuales análogas a las de la epilepsia humana, donde el principal criterio de evaluación, lo constituyen las alteraciones en la actividad electroencefalográfica (Contreras, 2000; Solís-Ortiz y Arauz-Contreras, 1989).

Los modelos de epilepsia experimental pueden clasificarse de acuerdo con los siguientes criterios generales:

- 1) **Mecanismo de inducción:** modelos farmacológicos y de inducción eléctrica.
- 2) **Propagación de las crisis:** modelos de epilepsia generalizada y parcial.
- 3) **Duración de las crisis:** modelos agudos y crónicos.
- 4) **Manifestaciones conductuales:** convulsivos (clónicos, tónicos, tónico-clónicos) y de ausencia.
- 5) **Vía de inducción:** aplicación tópica, administración sistémica y administración intracerebral del agente convulsionante (Contreras, 2000; Jeffreys, 2003; Solís-Ortiz y Arauz-Contreras, 1989; Granillo et al., 2002) (Cuadro 2).

### Modelo de Crisis Epileptiformes por 4-Aminopiridina

La 4-Aminopiridina (4AP) es un convulsionante capaz de inducir crisis electroencefalográficas y motoras en diferentes especies animales, incluyendo al humano, al administrarse a través de diferentes vías (Morales et al., 1996; Medina-Ceja et al., 2008). Las crisis convulsivas inducidas por 4AP se caracterizan por una etapa inicial de hiperexcitabilidad, seguida de convulsiones clónicas y tónico-clónicas generalizadas, que dependiendo de la dosis

administrada pueden dar origen a un periodo convulsivo largo o bien, conducir a la muerte del animal (Fragoso-Veloz et al., 1990).

**Cuadro 2.** Modelos experimentales de epilepsia.

<b>MODELO AGUDO PARCIAL</b>	<b>MODELO TÓNICO-CLÓNICO</b>	<b>MODELO PARCIAL COMPLEJO</b>
<b>Convulsionantes químicos</b> Penicilina Bicuculina Picrotoxina Estricnina Pilocarpina	<b>Convulsionantes químicos</b> Pentilene-tetrazol Picrotoxina Bicuculina 4-Aminopiridina	Ácido Kainico Toxina Tetánica "Kindling"
<b>Estimulación eléctrica aguda</b>	<b>Desórdenes metabólicos</b> Hipoxia Hipoglucemia Oxígeno hiperbárico Hipercapnia Uremia Hipertermia	<b>Administración en área límbica de convulsionantes químicos</b>
<b>MODELO CRÓNICO PARCIAL</b>	<b>Genéticos-Generalizados</b> Roedores susceptibles a crisis audiogénicas Gerbos fotosensibles Mandriles fotosensibles Electroshock	<b>Crisis Hipocámpicas</b> Células aisladas Cultivos isotípicos Tejido post-quirúrgico humano
<b>Aplicación tópica de metales</b> Hidróxido de aluminio Cobalto Tungsteno Zinc Hierro		<b>MODELO AUSENCIA GENERALIZADA</b> Estimulación talámica Foco cortical bilateral Opiáceos intraventriculares
<b>Lesiones por congelación</b>		<b>MODELO STATUS EPILEPTICUS</b> Litio-pilocarpina Cobalto-homocisteína Estimulación eléctrica recurrente

Modificado de Granillo et al., 2002

En cultivos neuronales de hipocampo de rata, la 4AP induce actividad epileptiforme, como resultado del bloqueo de las corrientes de potasio transitoria tipo  $I_A$  y de inactivación lenta tipo  $I_D$  (Rogawski y Backer, 1983), además de bloquear varios canales de potasio (K) tipo  $Kv7.2$ ,  $Kv7.3$ ,  $Kca2$  y  $Kca1.1$  (Kobayashi et al., 2008). El bloqueo de la corriente de potasio de tipo D, prolonga la duración del potencial de acción, promueve la entrada de calcio a la terminal nerviosa (Baracskey et al., 2008) y estimula la liberación de neurotransmisores por exocitosis (Etzion y Grossman, 2001). Así, la administración intracerebral de altas dosis de 4AP, tanto en el hipocampo como en la corteza entorrinal de ratas adultas, induce actividad epileptiforme y eleva los niveles extracelulares de los neurotransmisores GABA y Glu, entre otros (Medina-Ceja et al., 2000).

Caballero y col., sugirieron en 2007 que la distribución de las cargas de las aminopiridinas protonadas y su compleja unión, forma varios puentes de hidrógeno con el oxígeno (N<sup>+</sup>H<sup>+</sup>...O) carboxílico de los aminoácidos Thr107 o Ala111 en la subunidad  $\alpha$  de los canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje. Por lo que esta interacción conlleva al bloqueo de dichos canales.

El efecto excitador de la 4AP sobre la liberación de neurotransmisores es independiente de la sustancia mediadora, tipo de sinapsis o especie; y se relaciona directamente con la generación de crisis convulsivas *in vivo* o de actividad epileptiforme *in vitro* (Thesleff, 1980; Glover, 1982; Versteeg et al., 1995; Niittykoski et al., 2004). En sinaptosomas o rebanadas de diferentes regiones cerebrales, la 4AP promueve la liberación de GABA (Tapia y Sitges, 1982), Glu, acetilcolina, dopamina, norepinefina y serotonina. *In vivo*, la 4AP eleva los niveles extracelulares de los aminoácidos Glu, Asp y GABA (Morales-Villagran y Tapia 1996; Peña y Tapia 1999 y 2000), de la acetilcolina (Damsma et al., 1988) y también las catecolaminas (Morales-Villagran et al., 1999; Kovacs et al., 2003) y sus metabolitos en el hipocampo y el cuerpo estriado de ratas adultas, entre otras regiones.

En preparaciones *in vitro*, la 4AP prolonga la duración del potencial de acción (Van Bogaert y Snyders, 1982), eleva la frecuencia de disparo neuronal y aumenta la amplitud tanto de potenciales postsinápticos inhibidores como excitadores (Perrault y Avoli, 1991).

Las crisis convulsivas generadas por la 4AP, son similares a las que produce el ácido kaínico y se catalogan como parciales complejas de tipo límbico, debido a que se componen de automatismos motores, principalmente de tipo clónico y algunos tónicos, semejantes a ciertas conductas estereotipadas, que pueden evolucionar hacia las crisis tónico-clónicas generalizadas y al establecimiento del *status epilepticus*, dependiendo de la dosis (Morales-Villagran et al., 1996). La administración sistémica o intracerebral de 4AP produce una etapa inicial de hiperexcitación con erección de pelo, hiperventilación, mioclonos faciales y

exoftalmia; después de lo cual se presentan convulsiones clónicas de las extremidades delanteras con o sin pérdida de postura, carreras alocadas y convulsiones tónico-clónico generalizadas que pueden asociarse a la muerte del animal; sin embargo cuando no se produce la muerte, el animal presenta movimientos clónicos alternados con algunas contracciones tónicas de mediana intensidad (*status epilepticus*). Hacia el final del periodo convulsivo se presentan con frecuencia las sacudidas de perro mojado y comúnmente, el periodo convulsivo se acompaña de salivación (Fragoso-Veloz et al., 1990; Morales-Villagrán et al., 1996).

## **SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN QUE PARTICIPAN EN LA EPILEPSIA**

Aunque diversas evidencias experimentales han demostrado que la epilepsia es un trastorno neuronal complejo que implica alteraciones en diferentes sistemas de neurotransmisión a lo largo de varias regiones cerebrales, dos de ellos han sido particularmente estudiados, el GABAérgico y el glutamatérgico, en principio por la abundancia relativa de los aminoácidos GABA y Glu dentro del SNC, en comparación con otros neurotransmisores; pero también por sus efectos sinápticos rápidos, que en el adulto corresponden a la generación de potenciales post-sinápticos inhibidores mediados por GABA y de potenciales post-sinápticos excitadores mediados por Glu. Debido a que las crisis epileptiformes se presentan primordialmente, cuando se pierde el control de la excitabilidad neuronal, la participación del GABA y el Glu tanto en la generación como en la propagación y generalización de las crisis epileptiformes resulta esencial (Dichter, 1998).

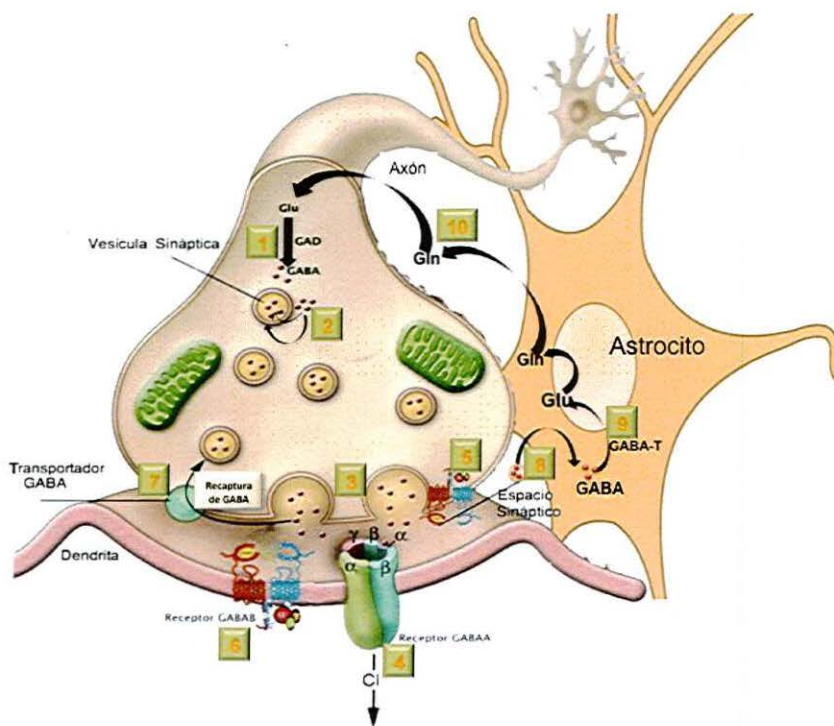
### **Neurotransmisión GABAérgica**

El GABA es un aminoácido neutro, gamma-carboxílico, cuya ruta de síntesis *in vivo* puede tener como precursor inicial a la glucosa; sin embargo, el piruvato y otros aminoácidos, también pueden actuar como precursores. Generalmente, la primera etapa en la síntesis del GABA implica la transaminación del  $\alpha$ -cetoglutarato por la enzima transaminasa del GABA (GABA-T), reacción en la

cual se genera L-Glu (Kandel et al., 2000). Entonces, la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), cataliza la alfa descarboxilación del Glu para producir GABA. Así, la GAD es considerada la enzima limitante para la síntesis de este aminoácido y generalmente, sólo se expresa en aquellas neuronas que lo utilizarán como neurotransmisor (Erlander y Tobin, 1991). A nivel de terminales nerviosas GABAérgicas, el GABA recién sintetizado por la GAD es reconocido selectivamente por el transportador vesicular de GABA (vGAT), que lo conduce hacia el interior de las vesículas sinápticas (Edwards, 1992). El vGAT transporta al GABA en contra de su gradiente de concentración, utilizando como fuerza promotora del transporte un gradiente positivo de protones, es decir se trata de un intercambiador  $H^+/GABA$  (Edwards, 1992; Hell et al., 1990). La generación de un potencial de acción y la propagación del estímulo hacia la terminal nerviosa inducen la liberación de GABA, preferentemente a través de la exocitosis de vesículas sinápticas, en un proceso que implica la entrada de  $Ca^{2+}$  a la terminal nerviosa (Deuth y Roth, 1999). Una porción menor del GABA puede liberarse a través de un mecanismo dependiente de  $Na^+$ , lo que al parecer, implica la inversión de los transportadores plasmáticos neuronales de GABA, los cuales en vez de transportarlo hacia el interior de la terminal lo llevan hacia el espacio intersináptico (Sítges et al., 1993).

Las neuronas y células post-sinápticas presentan receptores específicos para GABA, los cuales se clasifican en dos tipos:  $GABA_A$  y  $GABA_B$ , esta clasificación se basa en su respuesta farmacológica a diferentes agonistas, los que son sensibles al bloqueo por bicuculina se consideran  $GABA_A$ , mientras que los insensibles a bicuculina y que además, se activan en presencia del baclofen se consideran  $GABA_B$  (Bormann, 1998; Burt y Kamatchi, 1991). Los receptores  $GABA_A$  (R- $GABA_A$ ), son ionotrópicos, cuentan con un canal iónico acoplado a su estructura, el cual permite la difusión facilitada del ión cloruro ( $Cl^-$ ) durante la activación del receptor. Estructuralmente el R- $GABA_A$  se compone de cinco subunidades proteínicas, cada una de las cuales posee cuatro dominios transmembranales. Se han identificado 8 familias génicas, que dan origen a 19 subunidades proteínicas que pueden conformar al R- $GABA_A$  y que son las

siguientes:  $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-3,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$  y  $\rho$ 1-3 (Barnard et al., 1998). El tipo de subunidades que conforman al R-GABA<sub>A</sub> determina tanto la afinidad por diferentes sustratos, como las propiedades cinéticas de la conductancia del Cl<sup>-</sup> (Rudolph y Möhler, 2004; Lorez et al., 2000). Los R-GABA<sub>A</sub> poseen sitios de unión sensibles a: benzodiazepinas, barbitúricos, esteroides, anestésicos convulsionantes y anticonvulsionantes. Los R-GABA<sub>A</sub> son post-sinápticos y determinan la respuesta inhibitora rápida al GABA en la mayoría de las regiones del SN en la etapa adulta (Bormann, 1988) (Figura 1).



**Figura 1.** Sinapsis GABAérgica. 1) Síntesis de GABA; 2) Transporte vesicular de GABA; 3) Liberación de GABA por exocitosis; 4) Interacción del GABA con el R-GABA<sub>A</sub>; 5) y 6) interacción del GABA con el R-GABA<sub>B</sub> pre- y post-sináptico, respectivamente; 7) Recaptura neuronal de GABA; 8) Recaptura astroglial de GABA; 9) Degradación bioquímica del GABA por la transaminasa del GABA (GABA-T); 10) Transporte de glutamina (Gln) desde la astrogliá hacia la neurona presináptica. Esquema elaborado a partir de Kandel et al., 2000.

En el SNC del adulto la activación del R-GABA<sub>A</sub> produce típicamente inhibición neuronal por hiperpolarización, debido a que el gradiente electroquímico del Cl<sup>-</sup>, obliga al ión a entrar a la neurona. Sin embargo, Staley y colaboradores, reportaron en 1995, que la activación excesiva de los R-GABA<sub>A</sub> ubicados en las dendritas distales de las células piramidales de CA1 en el hipocampo, producía despolarización neuronal más que hiperpolarización, al parecer a través de un mecanismo que implica el movimiento de bicarbonato (Staley et al., 1995). Además, en etapas tempranas del desarrollo del SN el GABA también puede ejercer un efecto excitador, debido a que la activación del receptor GABA<sub>A</sub>, permite la salida del ión Cl<sup>-</sup>, lo que despolariza a la neurona y puede favorecer la activación de los canales de calcio sensibles a voltaje (Ben-Ari, 2002) (Figura 2). Este fenómeno se debe fundamentalmente a los niveles de expresión de los transportadores del ión Cl<sup>-</sup>, lo cuales regulan su gradiente de concentración se encuentran sobre-expresado tanto en cerebro inmaduro de humano y como en el de la rata (Dzhala et al., 2005). En el cerebro inmaduro la concentración de Cl<sup>-</sup> es mayor debido a la relativa baja expresión de KCC2 co-transportador de Cl<sup>-</sup> comparado con el cerebro maduro. Esta capacidad de cambiar de un modo de actuación inhibitorio a otro excitatorio es propia de las sinapsis GABAérgicas; y no sucede nada similar con los receptores catiónicos glutamatérgicos, los cuales no llegan a tener efectos inhibitorios, ni siquiera en condiciones patológicas (de Cabo-de la Vega et al., 2006).

El R-GABA<sub>B</sub> es un receptor de tipo metabotrópico, que regula directamente los canales de Ca<sup>2+</sup> e indirectamente los canales de K<sup>+</sup>, a través de la activación de la proteína G y la activación de segundos mensajeros. La interacción del GABA con el R-GABA<sub>B</sub> promueve la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) que produce ácido araquidónico (AA), el cual activa la proteína cinasa C (PKC), que fosforila los canales de Ca<sup>2+</sup> inactivándolos, para disminuir la liberación de neurotransmisores. Las corrientes de K<sup>+</sup> se afectan como consecuencia del cierre de los canales de Ca<sup>2+</sup> (Bormann, 1988).



El GABA extracelular pueda activar tanto a sus receptores sinápticos como a los transportadores plasmáticos que se encargan de removerlo del espacio intersináptico (Deutch y Roth, 1999). Estos transportadores se encuentran tanto en la membrana plasmática de neuronas GABAérgicas, como de la células gliales y forman parte de una familia de intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , los cuales acarrear al neurotransmisor junto con el  $\text{Na}^+$  hacia el interior de las células (Amara y Arriza, 1993). Topológicamente son proteínas integrales de membrana plasmática, conformados por 12 dominios transmembranales, los extremos amino y carboxi-terminal orientados hacia el citoplasma y con varios dominios sensibles a glucosilación y fosforilación en la cara extracelular (Clark, 1997). En la actualidad se acepta por lo menos la existencia de al menos cuatro tipos de transportadores plasmáticos para GABA (GAT), conocidos como GAT1-4. Los cuatro tipos de GAT tienen afinidad similar por el GABA, pero poseen afinidad completamente diferente por inhibidores de la recaptura, como tiagabina o el ácido nipecótico, sustancias que actúan preferentemente, con GAT 1 (Schousboe et al., 2004). Los GAT son expresados diferencialmente durante el desarrollo del SNC; y su expresión se modifica significativamente después de un daño neuronal excitotóxico o en condiciones neuropatológicas (Zhu y Ong 2004b; Conti et al., 2004) (Figura 1).

Dentro de las células nerviosas o gliales (principalmente astrocitos), la catálisis del GABA se lleva a cabo por acción de la amino-transferasa del GABA (GABA-T). La GABA-T es una de las enzimas de la matriz mitocondrial interna y la degradación del GABA, transfiere el grupo  $\alpha$ -amino del GABA, al carbono  $\alpha$  del  $\alpha$ -cetoglutarato, generando como productos al semialdehído succínico y al ácido glutámico (Erecinska y Silver 1990; Medina-Kauwe et al., 2004). Ambos productos de la GABA-T, pueden ingresar posteriormente al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y relacionarse con el metabolismo celular (Erecinska y Silver 1990). La actividad y expresión de la GABA-T es sensible a diferentes antiepilépticos que causan resistencia (Sulaimana et al., 2003) (Figura 1).

### *Distribución cerebral del GABA*

El GABA tiene una amplia distribución en el organismo, sin embargo, su concentración intracerebral es mayor (Tapia, 1983). En el SNC, el GABA se distribuye prácticamente en todas las regiones cerebrales y ejerce un control amplio sobre la excitabilidad neuronal del adulto, condiciones que lo definieron desde hace ya varios años, como el principal neurotransmisor inhibitor del SNC (Wu, 1983). Así, en algunas regiones como la corteza cerebral, los ganglios basales, el hipocampo y el cerebelo, la densidad de neuronas GABAérgicas es muy alta y llega a constituir hasta más del 50% de la población neuronal (Tapia, 1983; Wu, 1983; Ribak y Roberts, 1990; Retaux et al., 1992; Feldblum et al., 1993). Dentro de los ganglios basales, el cuerpo estriado, el globo pálido y la sustancia negra poseen una elevada densidad de interneuronas GABAérgicas. Además, en el estriado se localizan los somas de neuronas espinosas GABAérgicas, que proyectan su axón hacia la sustancia negra (compacta y reticulada) y al globo pálido (lateral y medial). En el globo pálido, también existen neuronas GABAérgicas que se proyectan al tálamo y al subtálamo; y en la sustancia negra reticulada, están las que se proyectan hacia el tálamo (Carlsson y Carlsson, 1990; Kincaid et al., 1992). En el cerebelo, las células de Purkinje, que se proyectan a los núcleos profundos cerebelares; las células en canasta, que inervan al soma de las de Purkinje; y las de Golgi, que hacen contacto con las granulosas; son neuronas GABAérgicas (Ribak y Roberts, 1990). En el hipocampo, las células en canasta que inervan a las neuronas piramidales, liberan GABA, lo mismo que múltiples interneuronas hipocámpales, corticales, del bulbo olfatorio y de la médula espinal.

Las neuronas GABAérgicas son de morfología variable (estrelladas, en canasta, de Purkinje, etc.), todas sintetizan GABA, pero se diferencian a través del estudio de sus aferencias sinápticas, por los neuropéptidos que coliberan (somatostatina y neuropéptido Y) o por la presencia de proteínas citosólicas que secuestran el calcio (parvalbumina, calcineurina y calbindina) que contienen (Retaux et al., 1992).

### *Implicaciones funcionales de la neurotransmisión GABAérgica*

La función primordial de la neurotransmisión GABAérgica en el adulto, es controlar la propagación de la excitabilidad neuronal en el cerebro (Cherubini et al., 1995; Fisher, 1989). Lo anterior se demostró de dos formas: 1) Al emplear antagonistas del R-GABA<sub>A</sub> tales como la bicuculina, la picrotoxina y la penicilina, que al interferir con la neurotransmisión GABAérgica, conducen a la hiperexcitabilidad neuronal y a la generación de crisis epileptiformes (Fisher, 1989); y 2) Al emplear compuestos como la vigabatrina y la tiagabina, que al inhibir la actividad de la GABA-T o la recaptura de GABA, respectivamente, elevan la concentración intracerebral del GABA y previenen la aparición de crisis epileptiformes (Loshner y Schmidt 1993; Taratara et al., 1989; Rogawski y Wolfgang, 2004).

Los cambios en la neurotransmisión GABAérgica también se asocian con la memoria y el aprendizaje, ya que se ha observado que la administración de antagonistas al GABA como la bicuculina y la picrotoxina, aumentan la retención cognoscitiva en pruebas de evitación pasiva, evitación activa y de reconocimiento de laberintos (Vakili et al., 2004). Además, las células GABAérgicas son altamente susceptibles a degenerar en padecimientos neurodegenerativos, después de crisis convulsivas en modelos de hipoxia-isquemia y en modelos de neurotoxicidad aguda o crónica (Romijn et al., 1988), por lo que se consideran determinantes de muchas de las alteraciones observadas en esas neuropatologías.

### **Neurotransmisión Glutamatérgica**

El ácido glutámico (Glu) es el principal neurotransmisor excitador del SNC de mamíferos. El Glu es un aminoácido dicarboxílico, no esencial, que puede sintetizarse dentro del cerebro a partir de  $\alpha$ -cetoglutarato, ornitina o glutamina (McGeer y McGeer, 1989). Una vez sintetizado en el citoplasma, el Glu es llevado hacia el interior de las vesículas sinápticas por transportadores vesiculares de Glu (vGluT), a través de un mecanismo dependiente del gradiente electroquímico de

H<sup>+</sup> que establece la ATPasa vacuolar y que también puede ser dependiente de Cl<sup>-</sup> (Hisano, 2003; Fremeaut et al., 2001). La liberación de Glu en la terminal sináptica puede realizarse a través de dos mecanismos: 1) independiente de la concentración de Ca<sup>2+</sup>, por cotransporte reverso de recaptura de Na<sup>+</sup> desde el citoplasma hacia el espacio intersináptico; y 2) dependiente de la elevación de Ca<sup>2+</sup> intracelular, a través de la exocitosis de vesículas sinápticas con el neurotransmisor (Kauppinen et al., 1988). El glutamato liberado al espacio intersináptico se remueve a través de un mecanismo de recaptura de alta afinidad. La dependencia de Na<sup>+</sup> es absoluta y se requieren al menos, dos iones Na<sup>+</sup> para recapturar una molécula de Glu (Stallcup et al., 1979; Takagaky et al., 1985). El Glu ejerce su efecto sobre la célula postsináptica a través de su interacción con receptores específicos, los cuales se clasifican en receptores de tipo ionotrópico y metabotrópico. Los receptores ionotrópicos glutamatérgicos a su vez se clasifican como receptores sensibles a: N-Metil-D-Aspartato (R-NMDA), ácido propiónico 3-amino-4-hidroxi-5-metil isoxazol (R-AMPA) y ácido Kaínico (R-KA) (Foster y Fagg, 1984; Watkins y Overman, 1987; Lipton y Rosenberg, 1994; Simeone et al., 2004). Estos receptores actúan como canales iónicos activados por ligando y permiten la entrada de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>, así como la salida del K<sup>+</sup> favoreciendo la despolarización rápida de la neurona (Simeone et al., 2004). Estructuralmente son complejos oligoméricos formados por 4 subunidades polipeptídicas, cada una de las cuales contiene 3 dominios transmembranales (TM1, 3 y 4) y TM2 penetra parcialmente la membrana. Para cada subunidad el grupo amino terminal es extracelular y el carboxilo terminal es intracelular. El R-NMDA se conforma por la subunidad NR1 (presenta 8 variantes NR1<sub>a-h</sub>) que determina la existencia de un canal funcional, en combinaciones variables con las subunidades NR2A-D o NR3A-B, que modifican las propiedades electrofisiológicas del canal (Simeone et al., 2004; Huntley et al., 1994; Mishina, 1995). Este receptor se caracteriza por su dependencia de voltaje, su alta permeabilidad al Ca<sup>2+</sup> y sus múltiples sitios de regulación farmacológica. Los receptores no-NMDA: R-AMPA y R-KA, también son complejos oligoméricos conformados por al menos 4 subunidades. Los R-AMPA tienen baja afinidad por el ácido kaínico y se conforman por las

subunidades Glu1-4; mientras que los R-KA pueden formarse a partir de las subunidades Glu5-7 y KA1-2, estas últimas elevan la afinidad del receptor por el ácido kaínico. Tanto los R-AMPA como los R-KA son independientes de voltaje y tienen mayor permeabilidad al  $\text{Na}^+$ , se encuentran en la mayoría de los casos en conjunción con el R-NMDA, y proporcionan la despolarización inicial suficiente para que este último pueda activarse (Monaghan et al., 1989).

Los receptores metabotrópicos para Glu regulan de cascadas de señalización intracelular, a través de su interacción con proteínas G. Existen al menos 8 subtipos, conocidos como mGlu1-8 y se caracterizan por ser proteínas integrales de membrana con siete dominios transmembranales y dos porciones hidrofílicas largas, una en el medio extracelular con el extremo amino y otra en la cara intracelular como extremo carboxilo (Simeone et al., 2004; Schoepp y Conn, 1993).

#### *Distribución cerebral del Glu*

Los estudios inmunocitoquímicos y neuroquímicos, sugieren que la mayoría de vías glutamatérgicas son aferencias que se proyectan desde y hacia la corteza cerebral e hipocampo. Esas vías incluyen la cortico-estriatal, la cortico-hipocámpal, la cortico-cortical, la entorrinal-hipocámpal; las hipocámpales y corticales que se dirigen hacia los núcleos hipotalámicos, talámicos y del tallo cerebral. Además, en el cerebelo existe una gran cantidad de receptores a Glu y las células granulares de la corteza cerebelosa parecen ser esencialmente glutamatérgicas (McGeer y McGeer, 1989).

El Glu que se libera de las neuronas glutamatérgicas, interactúa con otros sistemas de neurotransmisión que convergen en los blancos neuronales de las aferencias glutamatérgicas. Un ejemplo es lo que ocurre en el cuerpo estriado, región que recibe múltiples inervaciones glutamatérgicas desde la corteza cerebral (vía cortico-estriatal), que ejerce efecto sobre la liberación estriatal de dopamina, acetilcolina, GABA y serotonina en una estrecha relación recíproca (Becquet et al., 1990).

### *Implicaciones funcionales de la neurotransmisión glutamatérgica*

El Glu participa en múltiples funciones nerviosas, a través de la activación de sus diferentes tipos de receptores que se encuentran ampliamente distribuidos dentro del sistema nervioso. La activación de R-NMDA favorece la plasticidad neuronal, en procesos como la memoria, el aprendizaje, la dominancia ocular, la especificidad sináptica y el crecimiento neuronal; controla la transmisión sensorial visual, la respiración, presión sanguínea; y regula la iniciación de la actividad motora (Monaghan et al., 1989). Los receptores no-NMDA, los cuales aparecen comúnmente en las células que poseen R-NMDA, por lo que participan en funciones que dependen de la activación de los R-NMDA (Wade et al., 1987). El Glu también se encuentra implicado en procesos de "excitotoxicidad", término que se introdujo por primera vez para referirse a la muerte neuronal producida por la sobre activación de sus receptores glutamatérgicos (Olney et al., 1971) y que se ha asociado a diferentes estados patológicos del SNC, entre los que destacan la muerte neuronal por: epilepsia (Khor y Heinemann, 1989), hipoxia-isquémica (Siesjo y Bengtsson, 1989) y trauma cráneo-encefálico (Faden et al., 1989). Además, se le ha implicado en padecimientos crónico neurodegenerativos, tales como: la enfermedad de Huntington (Young et al., 1988), Alzheimer (Greenamyre et al., 1985) y el Parkinson (Turski et al., 1991), entre otras.

### **SUSCEPTIBILIDAD CONVULSIVA EN ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO.**

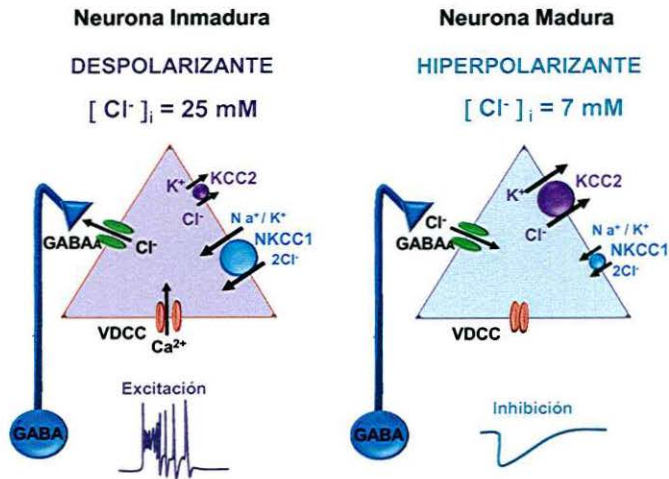
Se estima que el rango de crisis epileptiformes en recién nacidos al término es de 1 a 3 por cada 1000 nacidos vivos (Glass et al., 2009; Lanska et al., 1995; Saliba et al., 1992 y 1994). Además, se conoce que el primer año de vida del humano, representa el de más riesgo para la precipitación de estas crisis, particularmente cuando son crisis sintomáticas agudas (Annegers et al., 1995). En animales inmaduros, también se ha demostrado que la susceptibilidad a desarrollar crisis se eleva considerablemente en la etapa neonatal, con un aumento de mortalidad en etapas agudas. De esta forma, se considera que el cerebro inmaduro presenta condiciones electroquímicas propias, tendientes a la

hiperexcitabilidad (Swann et al., 1993; Holmes et al., 2003), debido primordialmente a que la activación del receptor GABA<sub>A</sub> en esta etapa, promueve la despolarización neuronal, más que la hiperpolarización (Khazipov et al., 2004; Loturco et al., 1995; Owens et al., 1996). En este sentido, se conoce que la despolarización neuronal mediada por GABA a través de la activación del receptor GABA<sub>A</sub>, eleva la concentración intracelular de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ), participando en la excitabilidad y muerte neuronales, en varias regiones del SN, entre las que se encuentra el hipocampo (Hollrigel et al., 2008), la neocorteza (Maric et al., 2001), el hipotálamo (Ben-Ari, 2006), el área tegmental ventral (Ye, 2000) y el cerebelo (Elliens et al., 2001); pero únicamente en el cerebro inmaduro y no, en las neuronas de animales adultos. En el cerebro inmaduro la concentración intracelular de Cl<sup>-</sup> es mayor debido a la elevada expresión del importador de Cl<sup>-</sup>, la proteína NKCC1; y a la baja expresión del exportador de Cl<sup>-</sup>, la proteína KCC2, en comparación con los niveles de expresión observados para estas proteínas en el cerebro maduro (Dzhala et al., 2005)(Figura 2). Así, en el cerebro de humanos, la proteína KCC2 está prácticamente ausente en la corteza fronto-parietal durante el primer año de vida, después de lo cual se incrementa gradualmente hasta alcanzar los niveles del adulto. Por otro lado, la proteína del exportador de Cl<sup>-</sup>, NKCC1, se sobre-expresa, tanto en el cerebro inmaduro de humano y como en el de rata (Dzhala et al., 2005). Además, la importancia de KCC2 para que el GABA ejerza su efecto inhibitorio, también ha sido demostrada en ratones *knockout* para KCC2, que generalmente mueren al nacer debido a una falla respiratoria, y en los cuales, se ha observado que las neuronas tienen respuestas excitadoras, tanto para el GABA como para la glicina (Hubner et al., 2001).

Además de las modificaciones en los niveles de expresión de los transportadores NKCC1 y KCC2, observados durante el desarrollo, también se ha descrito a través de modelos de *status epilepticus* en el cerebro inmaduro, que la expresión de la subunidad  $\alpha 1$  del R-GABA<sub>A</sub> es significativamente más alta que en el adulto, por lo que esto también podría contribuir a la excitación

mediada por GABA característica del cerebro inmaduro (Brooks-Kayal et al., 1998).

## GABA en Neuronas Inmaduras y Maduras



**Figura 2.** Esquema de los efectos excitador e inhibitor del GABA a través de la activación del R-GABA<sub>A</sub>, dependientes de la concentración intracelular del Cl<sup>-</sup>, ([Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>) a nivel neuronal. Se representan al importador de Cl<sup>-</sup>, NKCC1 (co-transportador de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>); al exportador de Cl<sup>-</sup>, KCC2 (co-transportador K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>) y los canales de calcio sensibles a voltaje (VDCC), así como la [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>. I) En la neurona inmadura: predomina la expresión de NKCC1, la [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> es alta, la activación del R-GABA<sub>A</sub> produce despolarización y apertura de los VDCC. II) Neurona madura: predomina la expresión de KCC2, la [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> es baja, la activación del R-GABA<sub>A</sub> produce hiperpolarización y los VDCC permanecen cerrados. Esquema elaborado a partir de Ben-Ari, 2002.

La excitación mediada por GABA en neuronas inmaduras opera en sinergia con la que induce el Glu a través de los R-NMDA (Ben-Ari et al., 1997). La despolarización que produce la activación de los R-GABA<sub>A</sub> es suficiente para remover el bloqueo dependiente de voltaje que ejerce el magnesio sobre los R-NMDA, lo que contribuye también a elevar significativamente la concentración



intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  (Leinekugel et al., 1995). El receptor NMDA es heteromérico e incluye estrictamente la subunidad NR1 para su conformación funcional, la cual se regula a lo largo del desarrollo. En el cerebro inmaduro, predominan las subunidades NR2, sobre todo la subunidad NR2B, a lo largo del tiempo decae funcionalmente, en comparación correlacionando al tiempo que se eleva la de la subunidad NR2A, que es la forma comúnmente expresada en la vida tardía de neuronas maduras (Wong et al., 2002). Estudios en roedores muestran que esas modificaciones ocurren durante las primeras dos semanas postnatales, periodo asociado con una baja sensibilidad del R-NMDA al bloqueo que ejerce el magnesio; lo que resulta en un aumento en la posibilidad de excitación neuronal (Hollmann y Heinemann, 1994; Jiang et al., 2007). En adición, los R-AMPA que en adulto son prácticamente impermeables a calcio, en etapas tempranas del desarrollo, tanto en roedores como en humanos, son altamente permeables a este ión, debido primordialmente a la falta de la subunidad GluR2 (Sanchez et al., 2001; Kumer et al., 2002). Los R-AMPA son heteroméricos y están conformados por cuatro subunidades, incluyendo la combinación de las subunidades GluR1-4 (Hollmann y Heinemann, 1994). La expresión de dichas subunidades también se regula durante el desarrollo, donde GluR2 mantiene niveles bajos de expresión hasta la tercera semana postnatal en roedores y en la corteza cerebral humana hasta el primer año de vida, después de lo cual se eleva significativamente hasta alcanzar los niveles del adulto, etapa en la cual la entrada de calcio a través de la activación de estos receptores es mucho menor, que lo observado en la etapa neonatal (Talos et al., 2006).

Eléctricamente, se ha descrito la presencia de un patrón único que domina la actividad neuronal en etapas tempranas del desarrollo, conocido como potenciales despolarizantes gigantes (GDPs), descritos inicialmente en el hipocampo, y que se ha observado tanto en neuronas piramidales de CA3 y CA1, como en células granulares y en interneuronas (Leinekugel et al., 1995, 1997, 1998 y 2002; Khazipov et al., 2001). Los GDPs son de larga duración (~300ms), recurrentes (0.1Hz), y representan la actividad mayoritaria en

hipocampo de roedores durante los primeras dos semanas de vida postnatal (Ben-Ari et al., 1989). Al parecer, el hipocampo inmaduro genera el patrón de inmadurez tipificado por los GDPs, que se propaga a través del sistema límbico entero (Leinekugel et al., 1998). Los GDPs participan en la modulación eléctrica de procesos esenciales para el desarrollo del SN, entre los que se incluyen: migración y crecimiento neuronal, formación de sinapsis y plasticidad en el desarrollo de las sinapsis de GABA (Owens y Kriegsten, 2002).

Por otro lado, se conoce que el cerebro inmaduro frecuentemente, pero no siempre, es más resistente que el cerebro prepúber y del adulto a desarrollar lesiones relacionadas con el *status epilepticus* a largo plazo (Albala et al., 1984; Holmes, 1997; Mikati et al., 2001). Aunque la sensibilidad a un estímulo epileptógeno y la severidad de las crisis son altas durante el desarrollo temprano, el hipocampo inmaduro es resistente al daño morfológico (Pitkanen et al., 2002; Cavalheiro et al., 1987; Swann y Moshé, 1997).

Así aunque se conocen los patrones de expresión de los co-transportadores NKCC1 y KCC2 asociados al desarrollo del SN, no se ha establecido con claridad su correlación con las modificaciones en la susceptibilidad convulsiva durante los primeros quince días de edad postnatal en la rata, por lo que en este trabajo se caracterizaron las modificaciones en la conducta motora y en la actividad epileptiforme inducidas por el convulsionante 4AP en esta etapa del desarrollo.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se conocen diferentes modificaciones neuroquímicas asociadas al desarrollo del SN que participan en el aumento de susceptibilidad convulsiva del neonato. Una de ellas la excitación mediada por GABA en etapas tempranas del desarrollo, la cual es dependiente de la expresión elevada del transportador NKCC1 y la expresión casi ausente del transportador KCC2, condición que eleva la concentración intracelular de  $Cl^-$ , y media la despolarización neuronal a través de la activación del R-GABA<sub>A</sub>. Aunque se ha avanzado en el conocimiento del patrón de expresión de dichos transportadores, y se conoce que el aumento en la expresión de KCC2 induce la modificación del efecto excitador al efecto inhibitor del GABA típico del adulto, se desconoce exactamente la edad en que este cambio sucede *in vivo* a lo largo de todo el SN, pues la mayoría de aproximaciones provienen de preparaciones *in vitro* de rebanadas de hipocampo, cuyos resultados varían al establecer la trasmutación del GABA entre el DEPN 7 y el 15, en la rata. Además, aunque se conocen ampliamente varios de los efectos de la 4AP en el adulto, no se han caracterizado las crisis epileptiformes que puede inducir *in vivo*, al administrarse sistémicamente en ratas, durante los primeros quince días del desarrollo postnatal. Por lo que la caracterización conductual y electroencefalográfica de las alteraciones producidas por la administración subcutánea de diferentes dosis de 4AP en diferentes edades durante los primeros 15 días de edad postnatal, permitirá conocer mejor cómo se modifica la susceptibilidad convulsiva de acuerdo con la maduración del sistema nervioso.

## **HIPOTESIS**

La severidad de las crisis epileptiformes inducidas por la administración sistémica de 4-aminopiridina disminuirá debido a la maduración de los sistemas de neurotransmisión conforme aumente la edad durante los primeros quince días de edad postnatal de la rata.

## OBJETIVOS

### General:

Evaluar las alteraciones inducidas por la administración subcutánea del convulsionante 4-aminopiridina sobre la conducta motora convulsiva y la actividad electroencefalográfica epileptiforme a lo largo de los primeros quince días de edad postnatal de la rata.

### Particulares:

1. Registrar las alteraciones producidas por la administración sistémica de diferentes dosis de 4-AP sobre la conducta motora convulsiva en ratas de 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 días de edad postnatal.
2. Describir las alteraciones generadas por la administración sistémica de 4-aminopiridina sobre la actividad electroencefalográfica, en la dosis mínima capaz de generar descargas epileptiformes, en al menos el 50% de los animales, a los 3, 7, 11 y 15 días de edad postnatal de la rata.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para la realización de este trabajo se utilizaron 208 ratas macho de la cepa Wistar de 1 a 15 días de edad postnatal (DEPN), las cuales desde su nacimiento se mantuvieron en condiciones de bioterio (ciclos luz-oscuridad 12X12h, temperatura ambiental  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa del  $50\pm 10\%$ ) en presencia de la madre, con libre acceso al agua y alimento, en camadas ajustadas a 8 crías. Cada animal se utilizó sólo una vez y los procedimientos se apegaron a la Ley General de Salud para la Protección de los Animales (Leyes y Códigos de México), la cual está de acuerdo con las normas oficiales mexicanas: NOM-062-ZOO-1999 y NOM-033-ZOO-1995, así como con la Guía de los Institutos Nacionales de Salud para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de los Estados Unidos de América.

### **EVALUACIÓN DE LAS ALTERACIONES SOBRE LA CONDUCTA MOTORA**

Para la elaboración de la curva dosis-respuesta de los efectos de la administración sistémica del convulsionante sobre la conducta motora se emplearon las dosis de 0.5, 1, 2 y 4 mg de 4AP/kg de peso corporal. El convulsionante se preparó un momento antes de administrarse, en dilución acuosa, ajustándola para administrar la dosis correspondiente en 50  $\mu\text{l}$ , por vía subcutánea en el pliegue dorsal del cuello a animales de 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 DEPN.

Inmediatamente después de la administración del convulsionante se registraron las alteraciones inducidas por el convulsionante sobre la conducta motora, de manera continua durante la primera hora y posteriormente, sólo se registraron las CTCG, la muerte o recuperación del animal durante por lo menos 4 horas. Para cada dosis y edad se utilizaron 6 animales.

Los resultados se presentan como una descripción de las principales alteraciones motoras presentadas. Además, se muestra la incidencia de CTCG

en número de animales que las presentaron y el número de eventos presentados durante el tiempo de observación. La incidencia de muertes también se representa en número de animales. Finalmente, se estimaron las latencias para el establecimiento de las CCG severas (con pérdida de la postura) y para la aparición de las CTCG, las cuales representan la media  $\pm$  desviación estándar de 6 animales para cada dosis y edad estudiadas. Las diferencias estadísticas entre las latencias se establecieron a través de la prueba t de *Student*, considerándose significativas aquellas con una  $p < 0.05$ . El análisis estadístico se realizó empleando el software Biostat 2007 v.2.2.0b.

### **EVALUACIÓN DE LAS ALTERACIONES SOBRE LA ACTIVIDAD ELECTROENCEFALOGRÁFICA.**

Animales de 3, 7, 11 y 15 DEPN se sometieron a una cirugía estereotáxica bajo anestesia con éter, empleando un adaptador para roedores neonatos (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA) y manteniendo la temperatura corporal en  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  (Homeothermic Blanket for Rodents, Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA). El animal se fija en el marco estereotáxico a través de las barras auriculares, con la barra de incisivos en 2 mm y la trompa dentro de una mascarilla que permitió inhalar éter durante la cirugía. En condiciones asépticas, se realizó una incisión longitudinal en sentido antero-posterior sobre la línea media, en la superficie dorsal de la cabeza. Posteriormente, se retiró el periostio para visualizar las cisuras craneales, se cauterizaron aquellos vasos que presentaron hemorragia y se inició con el proceso de toma de coordenadas y trepanación craneal para la implantación de los electrodos: 1) un electrodo auxiliar, representado por un tornillo al cual se fijaron dos alambres de cobre ( $250 \mu\text{m}$  de diámetro) y el cual se ubicó anterior al hueso frontal en 1 mm del lado derecho; 2) 2 electrodos de referencia, monopolares, representados por alambres de cobre ( $250 \mu\text{m}$  de diámetro), que se implantaron en la corteza cerebral motora (Fr1 de la rata) derecha e izquierda; y 3) 2 electrodos activos, monopolares, representados por alambres de cobre ( $250 \mu\text{m}$  de diámetro), que se implantaron en el hipocampo dorsal derecho e izquierdo. Las coordenadas utilizadas para cada edad se

describen en la Cuadro 3, considerando el punto Bregma como punto cero de referencia.

**Cuadro 3.** Coordenadas para la implantación de electrodos en las diferentes edades del estudio.

DEPN	Corteza cerebral motora			Hipocampo		
	Anterior	Lateral	Ventral	Posterior	Lateral	Ventral
3	1.25	±1.25	0.75	2.05	±1.65	1.75
7	1.5	±1.5	1	2.3	±1.9	2
11	1.75	±1.75	1.25	2.55	±2.15	2.25
15	2	±2	1.5	2.8	±2.4	2.5

Los electrodos se fijaron al cráneo con acrílico dental y se conectaron a un pin macho de seis puntas, que también se fijo al cráneo con acrílico dental. Enseguida se suspendió el anestésico y se dejó recuperar al animal sobre una colchoneta térmica a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  por algunos minutos. Después se traslado a una caja con viruta por al menos 2 horas, antes de iniciar el registro de la actividad electroencefalográfica.

El pin macho posicionado en la cabeza del animal se conectó a un pin hembra cuyas terminales se conectaron a los amplificadores (Grass Telefactor W, RI USA) de un Poligrafo Grass modelo 7D con las siguientes condiciones: calibración  $500 \mu\text{V}$ , sensibilidad 50, aumento 10X,  $1/2 \text{ amp}_{\text{low}}$  3-24. Después de las dos horas de recuperación, se registraron 10 minutos de actividad basal y 60 minutos posteriores a la aplicación de 4AP.

Inicialmente, en animales de 15 DEPN, se valoró el efecto de la administración de 4-AP las dosis de: 0.5, 1, 2 y 4 mg de 4AP/kg de peso corporal sobre la actividad electroencefalográfica. Entonces se observó, que si bien el convulsionante producía alteraciones conductuales casi inmediatamente después de su administración sistémica, el efecto sobre la actividad electroencefalográfica, particularmente a nivel de la generación de descargas



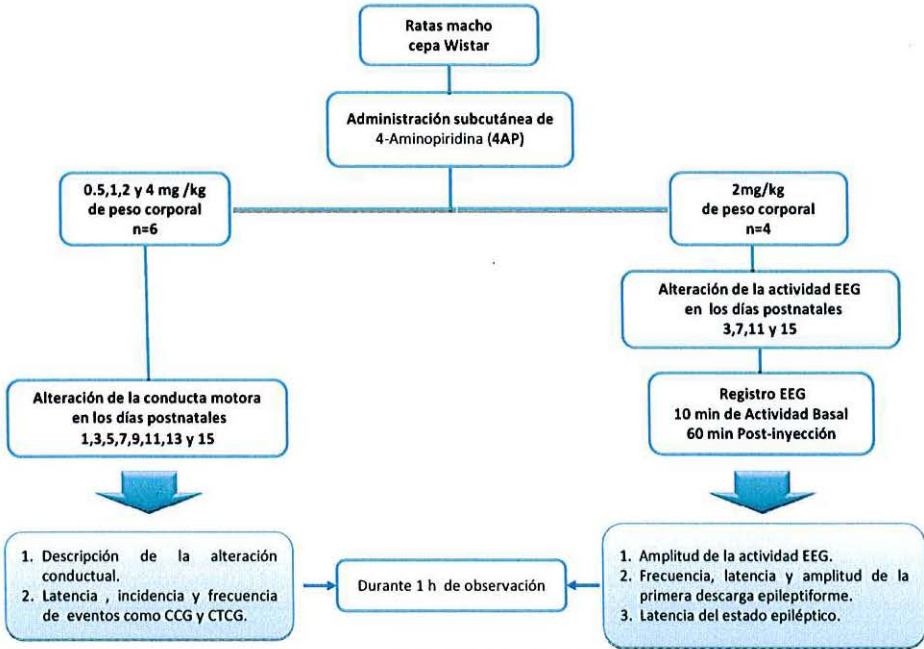
epileptiformes era mucho más retrasado. Así, las dosis de 0.5 y 1 mg no generaron descargas epileptiformes claras durante la primera hora después de su administración. En cambio, 4 mg de 4AP generaba convulsiones tan severas que la actividad electroencefalográfica se llenaba de demasiados artificios por el movimiento del animal e incluso, los animales perdían el implante durante las convulsiones. Por lo que, la dosis de 4AP empleada en estos experimentos fue de 2 mg/kg de peso corporal, aplicados de la misma forma que para las evaluaciones conductuales.

Al terminar de registrar la actividad electroencefalográfica, los animales se sacrificaron por decapitación, se les extrajo el cerebro y se verificó el sitio de colocación de los electrodos.

De manera general se evaluaron las modificaciones en la actividad electroencefalográfica, a través de la aparición de descargas epileptiformes y la modificación de la amplitud neta a lo largo del registro.

Los resultados de la latencia de aparición y duración de las descargas electroencefalográficas se expresan en segundos, representan la media  $\pm$  la desviación estándar de la media de 4 animales. En cuanto a la amplitud se consideró el valor neto y se expresa como la media  $\pm$  la desviación estándar de la media en  $\mu\text{V}$ . Las diferencias estadísticas entre las medias de los grupos experimentales se establecieron mediante de la prueba *t* de *Student* considerando significativas aquellas con una  $p < 0.05$ .

# DIAGRAMA EXPERIMENTAL



# RESULTADOS

## ALTERACIONES EN LA CONDUCTA MOTORA INDUCIDAS POR 4AP

En todas las edades del estudio, todas las dosis de 4AP utilizadas, produjeron alteraciones en la conducta motora, relacionadas con la aparición de convulsiones.

Los animales que fueron tratados con 0.5 mg/kg de 4AP mostraron clonos de extremidades delanteras, clonos cabeza, giros de barril, postración, retracción de las extremidades, extensión tónica de las extremidades, saltos y convulsiones clónicas generalizadas (CCG) leves (clonos de las extremidades y del cuerpo, como desplazamiento zig-zagueante del cuerpo hacia adelante) como alteración conductual más severa, que no evolucionó hacia la muerte del animal en ninguna edad (Cuadro 4).

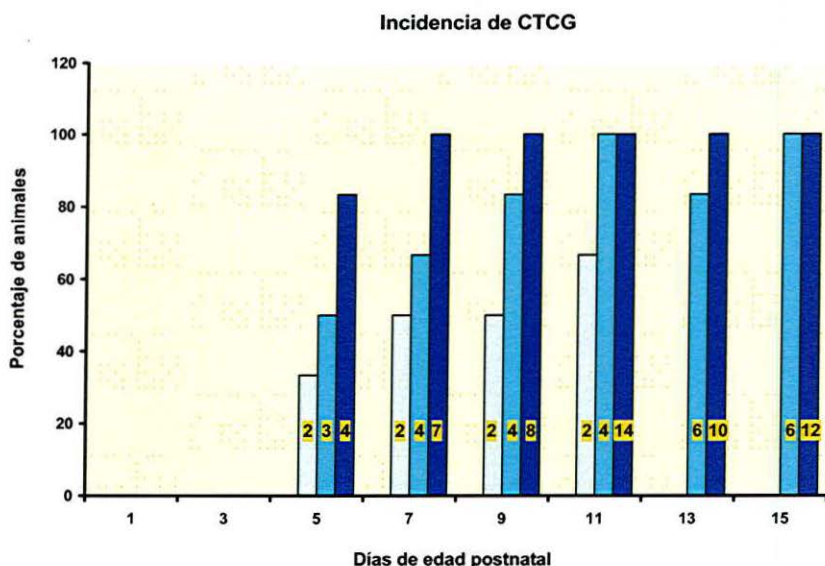
La dosis de 1 mg/kg de 4AP indujo alteraciones conductuales como saltos, temblor, mioclonos faciales, giros de barril, clonos de las extremidades delanteras, giros laterales, CCG leves del DEPN 1 al 3. En algunos animales, se presentaron CCG severas (clonos de las extremidades, del cuerpo y la cabeza con pérdida de la postura), que en algunos animales evolucionaron a convulsiones tónico-clónicas generalizadas (CTCG) entre los DEPN 5 al 11, y a la muerte del animal entre los DEPN 7 y 11 (Cuadro 4, Figuras 3 y 4).

Las dosis de 2 mg/kg de 4AP indujo saltos, clonos de las extremidades delanteras, giros de barril, mioclonos faciales, giros laterales, avance del cuerpo hacia atrás (retroceso), carreras alocadas, CCG leves y CCG severas, que en algunos animales evolucionaron a CTCG (Cuadro 4), alcanzando una incidencia del 100% al DEPN 11 (Figura 3). La muerte también se presentó en algunos animales y alcanzó una incidencia máxima del 66% en el DEPN 11 y 15 (Figura 4).

**Cuadro 4.**  
**ALTERACIONES EN LA CONDUCTA MOTORA PROMOVIDAS POR LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE 4AP DURANTE**  
**EL DESARROLLO POSTNATAL TEMPRANO DE LA RATA MACHO.**

DEPN	1				3				5				7				9				11				13				15			
Dosis de 4AP	.5	1	2	4	.5	1	2	4	.5	1	2	4	.5	1	2	4	.5	1	2	4	.5	1	2	4	.5	1	2	4	.5	1	2	4
Salto	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Clonos de extremidades delanteras	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tremor	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacudidas	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Giros de barril	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Retracción de las extremidades	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extensión tónica de extremidades anteriores	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extensión tónica de extremidades posteriores	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clonos cabeza	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Mioclonos faciales	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vocalizaciones	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Giros Laterales	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Retroceso	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Carreras alocadas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Convulsión clónica generalizada leve	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Convulsión clónica generalizada severa	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Convulsión tónica-clónica generalizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+

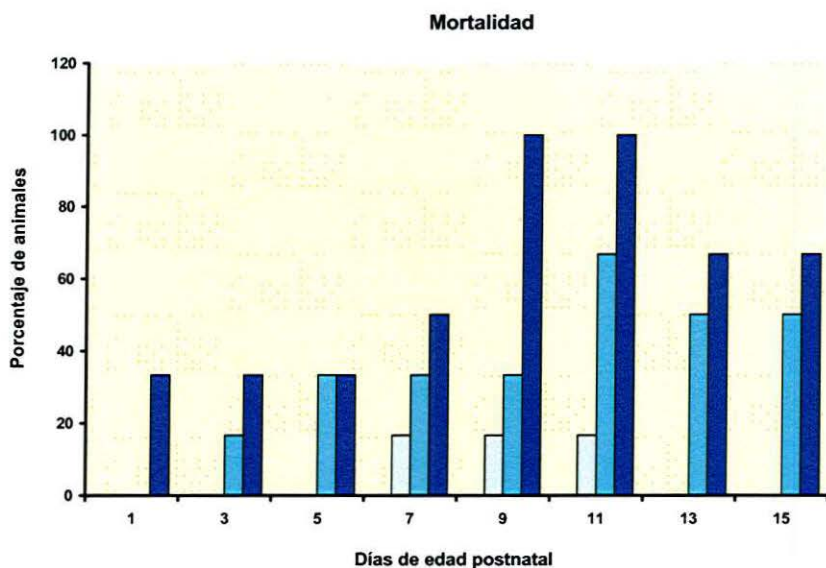
Los animales que recibieron 4 mg/kg presentaron saltos, clonos de las extremidades delanteras, giros de barril, mioclonos faciales, giros laterales, retroceso, carreras alocadas, CCG leves, CCG severas, y más de una CTCG (3-5 durante la primera hora) (Cuadro 4); lo que condujo a la muerte del animal. La incidencia de CTCG alcanzó el 100% desde el DEPN 7 hasta el DEPN 15 (Figura 3), en tanto que la muerte alcanzó la incidencia del 100% los DEPN 9 y 11 (Figura 4).



**Figura 3.** Incidencia de CTCG después de la administración sistémica de 1, 2 y 4 mg de 4AP/kg de peso corporal, durante los primeros 15 DEPN en ratas macho. La incidencia se expresa como porcentaje de animales en los que se presentó al menos 1 CTCG, donde la n = 6 en todos los casos. La dosis de 0.5 mg de 4AP/kg de peso corporal no indujo CTCG. La intensidad del color de las barras se relaciona directamente con la dosis del convulsionante. En el interior de las barras se cita el número máximo de CTCG presentado antes de la muerte, en animales que duraron convulsionando más de 4 horas.

La severidad de las convulsiones inducidas por 4AP se elevó conforme a la dosis del convulsionante en cada edad. Sin embargo, conforme a la edad, las convulsiones fueron leves al DEPN 1 y 3, ya que el síntoma más severo se

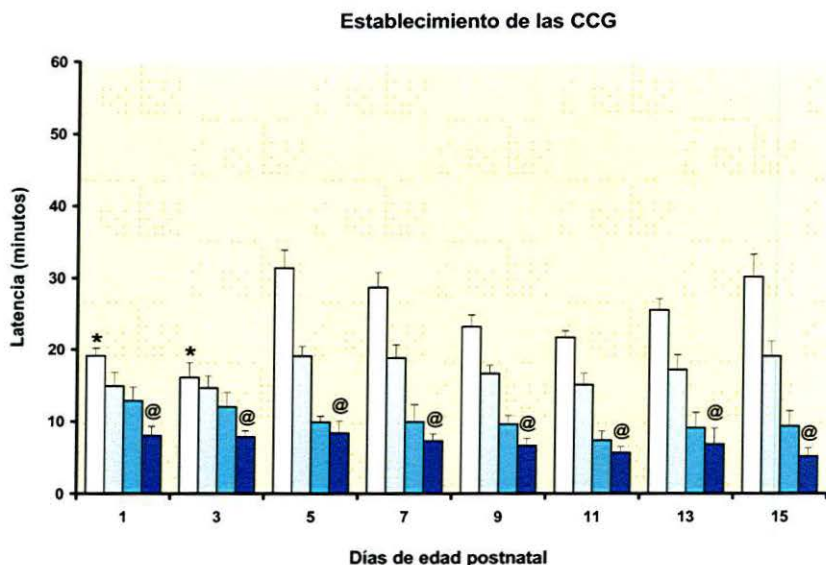
relacionó con CCG (Cuadro 4). A partir del DEPN 5, las crisis evolucionaron hacia CTCG (Cuadro 4 y Figura 3) y el número de animales que presentaron esta conducta, así como el número de eventos por animal (Figura 3) y el número de animales que murieron por las crisis, que se elevó considerablemente en los DEPN 9 y 11, para disminuir posteriormente (Figura 4).



**Figura 4.** Incidencia de animales muertos después de la administración sistémica de 1, 2 y 4 mg de 4AP/kg de peso corporal, durante los primeros 15 DEPN en ratas macho. La incidencia se expresa como porcentaje de animales, donde la  $n = 6$  en todos los casos. La dosis de 0.5 mg de 4AP no indujo la muerte en ningún animal de ninguna edad. La intensidad del color de las barras se relaciona directamente con la dosis del convulsionante.

La latencia para el establecimiento de las CCG inducidas por la administración sistémica de 0.5 mg de 4AP/kg de peso corporal, fue significativamente más corta en los DEPN 1 y 3, en comparación a lo observado en las demás edades. Además, la latencia para el establecimiento de las CCG, también fue

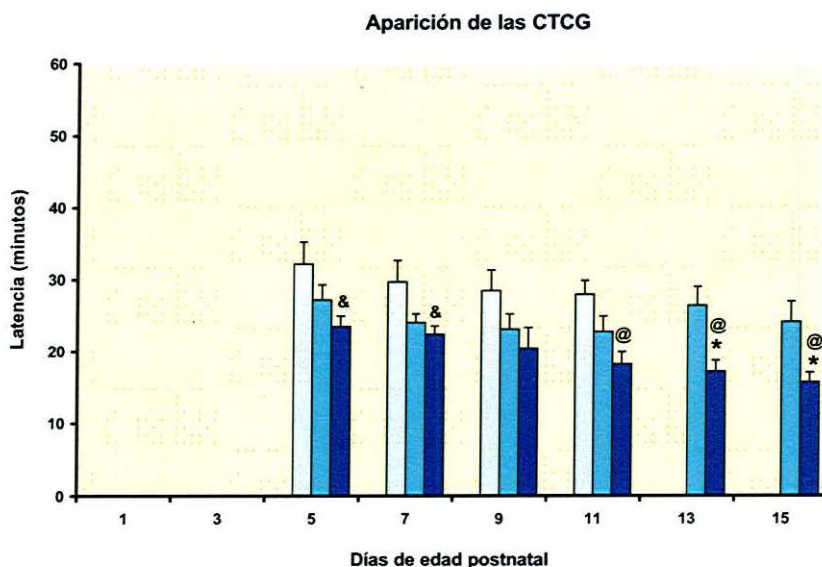
significativamente más corta, con la dosis de 4 mg de 4AP/kg de peso corporal, en comparación con las dosis de 0.5 y 1 mg (Figura 5).



**Figura 5.** Latencia para el establecimiento de las convulsiones clónicas generalizadas, producidas por la administración sistémica de 0.5, 1, 2 y 4 mg de 4AP/kg de peso corporal, durante los primeros 15 DEPN en ratas macho. La intensidad del color de las barras se relaciona directamente con la dosis del convulsionante. Los resultados muestran la media  $\pm$  la desviación estándar de la media de 6 animales por dosis y por edad. \* $p < 0.001$  en comparación con las demás edades empleando la misma dosis de 4AP; @ $p < 0.01$  en comparación con las dosis de 0.5 y 1 mg de 4AP para todas las edades estudiadas; por t de Student.

Por otro lado, la latencia de aparición de las CTCG inducidas por la administración sistémica de 1, 2 y 4 mg de 4AP/kg de peso corporal fue mayor en todas las edades y dosis a la latencia de establecimiento de las CCG severas (comparar Figuras 5 y 6). El incremento en la dosis de 4AP disminuyó la latencia de aparición de las CTCG, la cual en la dosis de 4 mg de 4AP/kg de peso corporal, tendió a disminuir conforme la edad de los animales aumentó. Sin embargo, la disminución en la latencia de aparición de las CTCG de

acuerdo con el incremento de la edad solo fue significativa al comparar los DEPN 13 y 15, respecto a los DEPN 5 y 7.



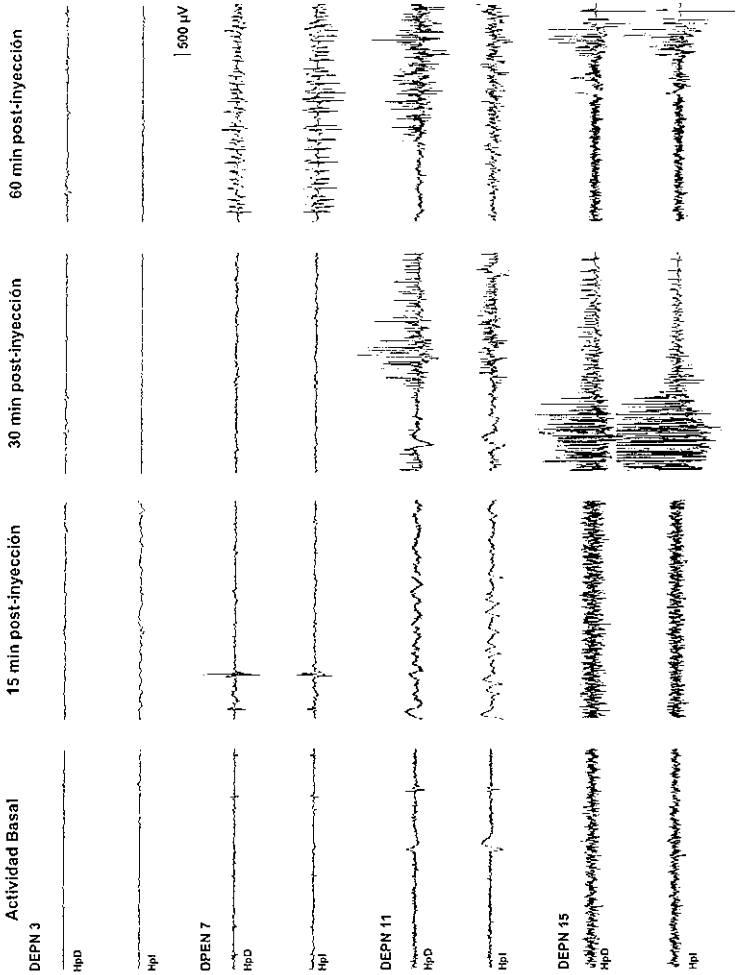
**Figura 6.** Latencia de aparición de las convulsiones tónico-clónicas generalizadas (CTGG), producidas por la administración sistémica de 1, 2 y 4 mg de 4AP/kg de peso corporal, durante los primeros 15 DEPN en ratas macho. La intensidad del color de las barras se relaciona directamente con la dosis del convulsionante. Los resultados muestran la media  $\pm$  la desviación estándar de la media de 2 a 6 animales que presentaron esta conducta por dosis y por edad (revisar Figura 2). \* $p < 0.05$  en comparación con las edades de 5 y 7 DEPN empleando la misma dosis de 4AP; @ $p < 0.01$  en comparación con las demás dosis para todas las edades; & $p < 0.005$  en comparación con la dosis de 1 mg de 4AP para todas las edades; por t de Student.

## ALTERACIONES EN LA ACTIVIDAD ELECTROENCEFALOGRÁFICA INDUCIDAS POR 4AP

El registro electroencefalográfico de la actividad basal previo a la administración de 4AP, muestra claramente que la amplitud neta de las descargas se eleva de acuerdo con la edad del animal (Figura 7), pasando de un valor promedio menor de 200  $\mu$ V observado al DEPN 3, hasta aproximadamente 800  $\mu$ V al DEPN 15 (Figura 8). La administración sistémica de 2 mg de 4AP/kg de peso

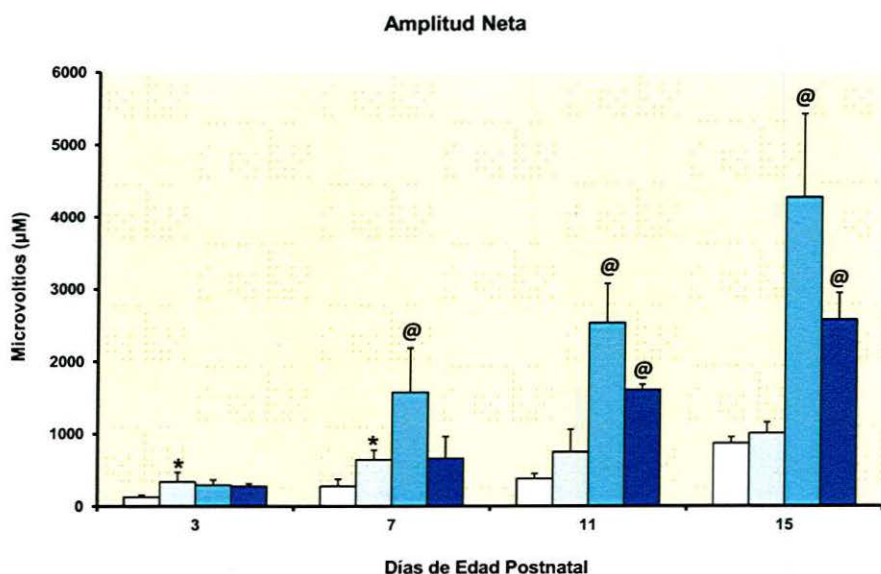


corporal indujo actividad electroencefalográfica epileptiforme asociada a las convulsiones en el 100% de los animales de 7, 11 y 15 DEPN. Sin embargo, en animales de 3 DEPN no se lograron observar las descargas epileptiformes ni durante las CCG, ni después de las CTCG (Figura 7).



**Figura 7.** Modificaciones en la actividad electroencefalográfica inducidas por la administración sistémica de 2 mg de 4AP/kg de peso corporal en ratas macho de 3, 7, 11 y 15 DEPN. La imagen muestra segmentos representativos de 1 minuto de duración, correspondientes al hipocampo derecho (HpD) e hipocampo izquierdo (HpI). Nótese las diferencias en actividad basal en las diferentes edades y la presencia de descargas epileptiformes.

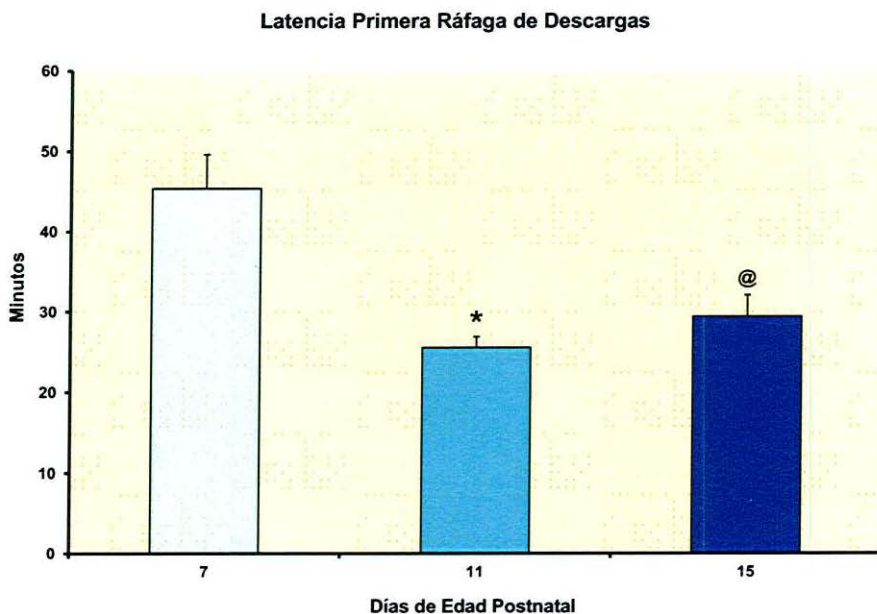
Después de la administración sistémica de 2 mg de 4AP/kg de peso corporal, la amplitud de la actividad electroencefalográfica se redujo drásticamente durante los primeros 5 min, después de los cuales se elevó gradualmente hasta alcanzar un valor máximo promedio de 4200  $\mu\text{V}$  a los 30 min en el DEPN 15 (Figura 8).



**Figura 8.** Modificaciones en la amplitud neta de la actividad electroencefalográfica inducidas por la administración sistémica de 2 mg de 4AP/kg de peso corporal a ratas macho de 3, 7, 11 y 15 DEPN. La barra blanca corresponde a lo observado en el minuto 5 de la actividad basal, las demás bandas en tonalidades de azul del claro al oscuro, corresponden a lo observado en un minuto, 15, 30 y 60 minutos después de la administración del convulsionante. Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar de la media del registro obtenido de ambos hemisferios de 4 animales por edad. \* $p < 0.05$  y @ $p < 0.001$  con respecto a la actividad basal en cada edad, a través de la prueba *t* de Student.

La primera ráfaga de descargas epileptiformes tuvo una latencia larga, presentándose después de la primera CTCG, alrededor de los 45 min posteriores en el DEPN 7, y alrededor de los 25 min en los DEPN 11 y 15 (Figura 9). Los animales presentaron de 2-4 CTCG, después de lo cual se

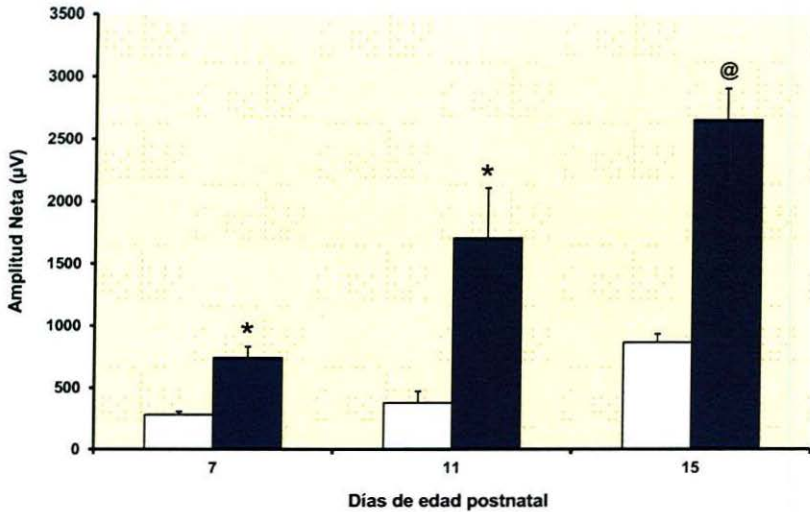
presentó la muerte, que en la mayoría de los casos fue alrededor de los primeros 90 minutos.



**Figura 9.** Latencia de la primera ráfaga de descargas epileptiformes inducida por la administración sistémica de 2 mg de 4AP/kg de peso corporal en ratas macho de 7, 11 y 15 DEPN. Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar de la media del registro obtenido de ambos hemisferios cerebrales en 4 animales por edad. \* $p < 0.05$  y @ $p < 0.001$  con respecto a lo observado el DEPN 7, a través de la prueba t de Student.

Finalmente, se observó que la amplitud de las descargas epileptiformes en la primera ráfaga generada por la administración sistémica de 2 mg de 4AP/kg de peso corporal, se incrementó en 2.6 veces al DEPN 7, en 4.5 veces al DEPN 11 y en 3 veces al DEPN 15, en relación a la amplitud neta observada en el minuto 5 de actividad electroencefalográfica basal (Figura 10).

### Primera Ráfaga de Descargas



**Figura 10.** Amplitud neta de la primera ráfaga de descargas epileptiformes inducida por la administración sistémica de 2 mg de 4AP/kg de peso corporal en ratas macho de 7, 11 y 15 DEPN. La barra blanca corresponde a lo observado en el minuto 5 de la actividad electroencefalográfica basal y la banda azul corresponde a la amplitud neta observada durante la primera ráfaga de descargas epileptiformes después de la administración del convulsionante. Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar de la media del registro obtenido de ambos hemisferios cerebrales de 4 animales por edad. \* $p < 0.01$  y @ $p < 0.001$  con respecto a la actividad basal y epileptiforme en cada edad, a través de la prueba *t* de Student.

## DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue caracterizar conductual y electroencefalográficamente, las crisis epileptiformes inducidas por 4AP durante el desarrollo postnatal temprano de rata, con la finalidad de identificar la edad de mayor susceptibilidad convulsiva para relacionarlo con la excitación neuronal mediada por GABA a través de la activación del R-GABA<sub>A</sub>. En todas las dosis y edades estudiadas, la administración sistémica de 4AP indujo hiperexcitabilidad motora que evolucionó hacia las CCG (sin pérdida de la postura), las cuales permanecieron por al menos 3 h; del DEPN 5 las CCG se hicieron más severas y aparecieron las CTCG, que en algunos casos condujeron a la muerte del animal (Cuadro 4, Figuras 3 y 4). El patrón convulsivo observado en este trabajo por efecto de la administración sistémica de 4AP, corresponde a lo descrito por otros autores, con la diferencia de que por la inmadurez de los animales las dosis empleadas en este trabajo son mucho menores que las empleadas en animales adultos de la misma cepa de ratas (Fragoso-Veloz et al., 1990; Morales-Villagran et al., 1996; Mihaly et al., 2001; Vilagi et al., 2009). Este fenómeno podría estar relacionado con dos hechos particulares las condiciones electroquímicas propias de las neuronas en etapas tempranas del desarrollo, tendientes a la hiperexcitabilidad (Swann et al., 1993; Holmes et al., 2003); así como por la inmadurez de la barrera hematoencefálica (Ek et al., 2006).

La severidad de las crisis en cada edad estudiada fue dependiente de la dosis del convulsionante y también, el efecto de cada dosis fue dependiente de la edad. De esta forma, la incidencia de CTCG y de la muerte se elevó conforme a la dosis de 4AP; y la dosis de 4 mg de 4AP/kg de peso corporal indujo CTCG en todas las edades excepto los DEPN 1 y 3, además de inducir la muerte en todas las edades estudiadas, pero afectando al 100% de los animales solo en los DEPN 9 y 11 (Figuras 3 y 4). Interesantemente, también la dosis de 2 mg de 4AP/kg de peso corporal, no indujo descargas epileptiformes en el DEPN 3.

Estos resultados evidentemente están relacionados con las modificaciones en las propiedades electroquímicas de las neuronas y con el establecimiento de circuitos neuronales, que se suceden durante el desarrollo postnatal temprano (Albala et al., 1984; Holmes et al., 2003). En este sentido, como ya se ha mencionado anteriormente, en etapas tempranas del desarrollo neuronal la activación del receptor GABA<sub>A</sub> induce despolarización, más que hiperpolarización (Loturco et al., 1995; Owens et al., 1996; Khazipov et al., 2004); y esa despolarización eleva la concentración intracelular de calcio ([Ca<sup>2+</sup>]) en varias regiones del SNC, entre las que se incluye al hipocampo (Ben-Ari, 2006). La excitación mediada por GABA, depende fundamentalmente de una elevada concentración intracelular de Cl<sup>-</sup>, la cual se establece por los niveles elevados de expresión del importador de este ión, la proteína NKCC1; y la expresión casi nula del exportador de Cl<sup>-</sup>, la proteína KCC2, en etapas tempranas del desarrollo (Holmes et al., 2002; Dzhala et al., 2005), por lo que al activarse el R-GABA<sub>A</sub>, se favorece la salida del Cl<sup>-</sup> y la neurona se despolariza. En este sentido, se ha descrito que el pico de expresión de NKCC1 se presenta el DEPN9 en el hipocampo de la rata (Dzhala et al., 2005) y el DEPN11 en la corteza entorrinal (Ureña-Guerrero et al., 2010); por lo que en esas edades el efecto excitador del GABA puede ser mayor. Así, debido a las implicaciones del circuito hipocampo-corteza entorrinal-hipocampo en la actividad epileptiforme (Bragin et al., 2009), los niveles de expresión de la proteína NKCC1, también podrían relacionarse con la mayor susceptibilidad convulsiva observada en este estudio después de la administración sistémica de 4AP, particularmente en los DEPN 9 y 11. En este sentido, la actividad anticonvulsiva de la bumetanida (inhibidor de NKCC1) como pre-tratamiento, en las CTGG inducidas por la administración sistémica de pentilnetrazol en ratas, fue mayor al DEPN 12 (Mares, 2009), resultado que los autores relacionaron directamente con los niveles de expresión de NKCC1. Sin embargo, debe considerarse que las modificaciones observadas en la susceptibilidad convulsiva durante los primeros 15 DEPN también estarían participando otros sistemas de neurotransmisión, así como canales iónicos y vías de señalización (Jensen,

2009). Así, se ha demostrado que la excitación mediada por la activación del R-GABA<sub>A</sub> opera en sinergia con los R-NMDA en etapas tempranas del desarrollo (Ben-Ari et al., 1997), cuando el bloqueo que ejerce el magnesio sobre estos receptores es menos eficiente y las corrientes de calcio que se generan por su activación son de mayor amplitud (Hollmann y Heinemann, 1994; Leinekugel et al., 1995; Wong et al., 2002; Jiang et al., 2007). Además, los R-AMPA que en adulto no son permeables a calcio, en neuronas de roedores y humanos inmaduros sí lo son, debido a la ausencia de la subunidad GluR2 (Sanchez et al., 2001; Kumer et al., 2002). La entrada de calcio a la neurona, a través del R-GABA<sub>A</sub> o de los receptores NMDA y AMPA participa en la diferenciación y migración neuronal (Behar et al., 1998), así como en la reorganización sináptico (Kandler et al., 2004). Sin embargo, la sobre activación de estos receptores puede conducir a la muerte neuronal (Lopez-Perez et al., 2010) o a modificaciones en la composición en subunidades de dichos receptores, y particularmente del receptor GABA<sub>A</sub> (Poulter et al., 2007), así como de los transportadores a cloro KCC2 (Ganguly et al., 2001). Dichas modificaciones además, se han relacionado con la propensión a las crisis epilépticas y con la resistencia a anticonvulsionantes en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (Bragin et al., 2009).

Por otro lado, lo observado en este trabajo en los DEPN 1 y 3, sugieren que los núcleos del tallo cerebral y sus vías descendentes propuestas por Browning y Nelson en 1985, como generadores de las CTCG, no han madurado completamente, a pesar de que ya deben tener cierto nivel de funcionalidad al nacimiento ya que controlan la respiración (Mares, 2009). Respecto a la disociación electroclínica observada al DEPN 3, donde la administración de 4AP no generó descargas epileptiformes (Figura 7), diversos estudios han demostrado que en humanos las crisis clónicas familiares benignas, las clónicas de la infancia y algunas crisis febriles del neonato también presentan este fenómeno, particularmente cuando los recién nacidos no llegaron a término en su desarrollo embrionario (Jensen, 2009).

Finalmente, es importante señalar que los DEPN 9 y 11 de la rata, se estiman correspondientes al recién nacido del humano (Haut et al., 2004; Jensen, 2009), por lo que es importante continuar con la caracterización de los mecanismos neuroquímicos, celulares y moleculares implicados en la elevada susceptibilidad convulsiva de esta etapa del desarrollo en la rata, para contribuir así, a la generación de conocimientos que permitan mejorar las estrategias de tratamiento de las crisis neonatales del humano .



## CONCLUSIONES

1. De acuerdo con la incidencia de CTCG y la muerte, que se registraron en este trabajo, la severidad de las crisis convulsivas inducidas por la administración sistémica de 4AP, se eleva significativamente después del DEPN 7 y empieza a disminuir alrededor del DEPN 13.

2. El período de mayor susceptibilidad convulsiva reportado aquí entre los DEPN 7 y 13, coincide con los niveles de expresión más altos, observados para el importador de  $Cl^-$ , la proteína NKCC1, en el hipocampo y la corteza fronto-parietal de la rata durante el desarrollo postnatal temprano, lo que determinaría entonces, un mayor efecto excitador del GABA, a través de la activación del R-GABA<sub>A</sub>.

## LITERATURA CITADA

1. Aicardi J, Chevrie JJ (1970) Convulsive Status epilepticus in infants and children: a study of 239 cases. *Epilepsia* 11:187-97
2. Albala BJ, Moshe SL, Okada R (1984) Kainic-acid-induced seizures. A developmental study. *Brain Res* 315:139-148.
3. Amara SG, Arriza JL (1993) Neurotransmitters transport three distinct gene families. *Curr Op Neurobiol* 3:337-344.
4. Annegers JF, Hauser WA, Lee JR, Rocca WA (1995) Incidence of acute symptomatic seizure in Rochester, Minnesota, 1935-1984. *Epilepsia* 36:327-333.
5. Baracskaý P, Szepesi Z, Orbán G, Juhász G, Czúrkó A (2008) Generalization of seizures parallels the formation of "dark" neurons in the hippocampus and pontine reticular formation after focal-cortical application of 4-aminopyridine (4-AP) in the rat. *Brain Res* 1228:217-28.
6. Barker JL, Behar T, Li YX, Liu QY, Ma W, Maric D, Maric I, Schaffner AE, Serafini R, Smith SV, Somogyi R, Vautrin JY, Wen XL, Xian H. (1998) GABAergic cells and signals in CNS development. *Perspect Dev Neurobiol* 5:305-322.
7. Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998) International Union of pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50:291-313.
8. Becquet D, Faudon M, Henry R (1990) In vivo evidence for an inhibitory glutamatergic control of serotonin release in the cat caudate nucleus: involvement of GABA neurons. *Brain Res* 519:82-88.
9. Ben-Ari Y (2001) Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci* 24:353-360.
10. Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of GABA during development: The nature of the nature. *Nat Rev Neurosci* 3(9):728-739.
11. Ben-Ari Y (2006) Basic developmental rules and their implications for epilepsy in the immature brain. *Epileptic Disord* 8:91-102.
12. Ben-Ari Y (2007) GABA, a key transmitter for fetal brain maturation. *Med Sci (Paris)* 23(8-9):751-5.
13. Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurons. *J Physiol (Lond.)* 416:303-325.
14. Ben-Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O, Gaiarsa JL (1997) GABA<sub>A</sub>, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'ménage à trois'. *Trends Neurosci* (11):523-529.
15. Bergamasco B, Penna P, Ferrero P, Gavinelli R (1984) Neonatal hypoxia and epileptic risk: a clinical prospective study. *Epilepsia* 25:131-146.
16. Bormann J (1988) Electrophysiology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor subtypes. *Trends Neurosci* 11:112-116.
17. Bragin DE, Sanderson JL, Peterson S, Connor JA, Müller WS (2009) Development of epileptiform excitability in the deep entorhinal cortex after status epilepticus. *Eur J Neurosci* 30(4):611-24.
18. Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin H, Rikhter TY, Coulter DA (1998) Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat Med* (10):1166-72.

19. Burt DR, Kamatchi GL (1991) GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB J* 5:2916:2923.
20. Caballero NA, Meléndez FJ, Niño A, Muñoz-Caro Camelia (2007) Molecular docking study of the binding of aminopyridines within the K<sup>+</sup> channel. *J Mol Model* 13: 579-586.
21. Carlsson M, Carlsson A (1990) Interaction between glutamatergic a monoaminergic systems within of the nigrostriatal pathway alter the expression of glutamate decarboxylase messenger RNA in rat globus pallidus projection neurons. *Neuroscience* 13:72-76.
22. Cavalheiro EA, Silva DF, Turski L (1987) The susceptibility of rats of pilocarpine-induced seizures is age dependent. *Dev Brain Res*; 465:43-58.
23. Chen G, Trombley PQ, van den Pol AN (1996) Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurons. *J. Neurophysiol* 494:451-464.
24. Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y (1991) GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci* 14:515-519.
25. Clark JA (1997) Analysis of the transmembrane topology and membrane assembly of the GAT-1  $\gamma$ -aminobutyric transporter. *J Biol Chem* 272:14695-14704.
26. Conti F, Minelli A, Melone A (2004) GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, developmental and pathological implications. *Brain Res Rev* 5:196-212.
27. Contreras D (2000) Modelos experimentales de epilepsia. *Rev Neurol* 30:370-376.
28. Damsma G, Biessels PTM, Westerink BHC, De Vries JB, Horn AS (1988) Differential effects of 4-aminopyridine and 2,4-diaminopyridine on the in vivo release of acetylcholine and dopamine in freely moving rat measured by intrastriatal dialysis. *Eur J Pharmacol* 145:15-20.
29. De Cabo-de la Vega C, Villanueva-Hernández P, Prieto-Martín A (2006) Neuroquímica de la epilepsia, neurotransmisión inhibitoria y modelos experimentales: nuevas perspectivas. *Rev Neurol* 42(3):159-168.
30. Delpire E, Mount DB (2002) Human and murine phenotypes associated with defects in cation-chloride cotransport. *Ann Rev Physiol* 64:803-843.
31. Deutch AY, Roth RH (1999) Neurotransmitters, En: *Fundamental Neuroscience* (Zigmond MJ, Bloom MD, Roberts JL, Landis SC, Squire LR, eds.) Academic Press, New York, p.p. 167-180.
32. Dias-Silva J (2002) Guía de manejo de la epilepsia. *Guías Clínicas* 2(6) [www.fisterra.com/guias2/epilepsia.htm](http://www.fisterra.com/guias2/epilepsia.htm).
33. Dichter MA (1998) The Neurobiology of Epilepsy. En: *Epilepsy* (Engel J, Pedley TA, eds.), Lippincott Williams & Wilkins, New York, p.p. 4943-4949.
34. Dupon S, Crespel A (2009) Status epilepticus: epidemiology, definitions and classifications. *Rev Neurol (Paris)* 164(4):307-14.
35. Dzhalal VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, Delpire E, Jensen FE, Staley KJ (2005) NKCC1 transporter facilitates seizures in developing brain. *Nat Med* 11(11):1205-1213.
36. Edwards RH (1992) The transport of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Curr Op Neurobiol* 2:586-594.
37. Ek CJ, Dziegielewska KM, Stolp H, Saunders NR (2006) Functional effectiveness of the blood-brain barrier to small water-soluble molecules in developing and adult opossum (*Monodelphis domestica*). *J Comp Neurol* 496(1):13-26.
38. Ekman M, Forsgren L (2004) Economic evidence in epilepsy: a review. *Eur J Health Econom* 5(suppl. 1):S1-S6.
39. Erlander MG, Tobin AJ (1991) The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem Res* 16(3):215-226.

40. Etzion Y, Grossman Y (2001) Highly 4-aminopyridine sensitive delayed rectifier current modulates the excitability of guinea pig cerebellar Purkinje cells. *Exp Brain Res* 139:419-25.
41. Feldblum S, Erlander MG, Tobin AJ (1993) Different distributions of GAD<sub>65</sub> and GAD<sub>67</sub> mRNAs suggest that the two glutamate decarboxylases play distinctive functional roles. *J Neurosci Res* 34:689-706.
42. Feria-Velasco A, Muñoz-Martinez D, Rubbio-Donnadieu F (1997). *Epilepsia. Aspectos neurobiológicos, médicos y sociales*. Cognos Editores, México.
43. Feria-Velasco AI, Barajas-Mercado S, Feria-Cuevas Y (2010). Bases fisiopatológicas de la epilepsia. En: *Tópicos de actualización en Neurobiología. Excitotoxicidad y cognición en enfermedades neurodegenerativas: Aspectos básicos, clínicos y sociales*. Universidad de Guadalajara, México.
44. Fisher RS (1989) Animal models of the epilepsy. *Brain Res Rev* 14:245-278.
45. Foster AC, Fagg GE (1984) Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: Their characteristics and relationship to synaptic receptors. *Brain Res Rev* 7:103-164.
46. Frago-Veloz J, Massieu L, Alvarado R, Tapia R (1990). Seizures and wet dog shakes induced by 4-AP and their potentiation by nifedipina. *Eur J Pharmacol* 178(3):275-284.
47. Fremeaut RT Jr, Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 31:247-260.
48. Glass HC, Pham TN, Danielsen B, Towner D, Glidden D, Wu YW (2009) Antenatal and intrapartum risk factors for seizures in term newborns: a population-based study, California 1998-2002. *J Pediatr* 154:24-28.e1.
49. Glover WE (1982) The aminopyridines. *Gen Pharmacol* 13:259-285.
50. Granillo RJ, Zanniello G, Cristiano A (2002) Epilepsias. Modelos experimentales. *Epileptogénesis. Rev Neurol Arg* 27:31-40.
51. Haut SR, Velisková J, Moshé SL (2004) Susceptibility of immature and adult brains to seizure effects. *Lancet Neurol* 3:608-17.
52. Helf JW, Maycox PR, Jahn R (1990) Energy dependence and functional reconstitution of the aminobutyric acid carrier from synaptic vesicles. *J Biol Chem* 265:2111-2117.
53. Hisano S (2003) Vesicular glutamate transporters in the brain. *Anat Sci Int* 78:191-204.
54. Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Ann Rev Neurosci* 17:31-108.
55. Hollrigel GS, Ross ST, Soltesz I (1998) Temporal patterns and depolarizing action of spontaneous GABA<sub>A</sub> receptor activation in granule cells of the early postnatal dentate gyrus. *J Neurophysiol* 80:2340-2351.
56. Holmes GL (1997) Epilepsy in the developing brain: lessons from laboratory and clinic. *Epilepsia* 38, 12-30.
57. Holmes GL, Khazipov R, Ben-Ari Y (2002) New concepts in neonatal seizures. *Neuroreport* 13:3-8.
58. Huntley GW, Vickers JC, Morrison JH (1994) Cellular and synaptic localization of the NMDA and no-NMDA receptor subunits in neocortex: organizational features related to cortical circuitry, function and disease. *Trends Neurosci* 17:536-543.
59. Jensen FE (2009) Neonatal Seizures: An Update on Mechanisms and Management. *Clin Perinatol* 36(4):881.
60. Jiang Q, Wang J, Wu X, Jiang Y.(2007) Alterations of NR2B and PSD-95 expression after early-life epileptiform discharges in developing neurons. *Int J Dev Neurosci* 25(3):165-170.

61. Kandel E, Schwartz J, Jessell T (2000) The brain and Behavior. Principles of Neural Science. USA McGraw-Hill. pp 175-228.
62. Kandler K (2004) Activity-dependent organization of inhibitory circuits: lessons from the auditory system. *Curr Opin Neurobiol* 14(1):96-104.
63. Kauppinen RA, McMahon HT, Nicholls DG (1988) Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup> independent glutamate release, energy status and cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration and isolated nerve terminals following metabolic inhibition possible relevance to hypoglycemia and anoxia. *Neuroscience* 27:175-182.
64. Khazipov R, Khalilov I, Tyzio R, Morozova E, Ben-Ari Y, Holmes GL (2004) Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 19(3):590-600.
65. Kincaid AE, Albin RL, Newman SW, Penny JB, Young AB (1992) 6-Hydroxidopamine lesions of the nigrostriatal pathway alters the expression of glutamate decarboxylase messenger RNA in rat globus pallidus projection neurons. *Neuroscience* 51:705-718.
66. Kobayashi K, Nishizawa Y, Sawada K, Ogura H, Miyabe M (2008) K<sup>+</sup>-Channel openers suppress epileptiform activities induced by 4-aminopyridine in cultured rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Sci* (4):517-528.
67. Kovacs A, Mihaly A, Komaromi A, Gyengesi E, Szente M, Weiczner R, Krisztin-Peva B, Szabo G, Telegdy G (2003) Seizure, neurotransmitter release, and gene expression are closely related in the striatum of 4-aminopyridine-treated rats. *Epilepsy Res* 55:117-29.
68. Lanska MJ, Lanska DJ, Baumann RJ (1995) A population-based study of neonatal seizures in Fayette County, Kentucky. *Neurology* 45:724-732.
69. Leinekugel X, Khalilov I, McLean H, Caillard O, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y, Khazipov R (1999). GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in neonatal brain. *Adv. Neurol.* 79, 189-201
70. Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids a final common pathway for neurologic disorders. *New Eng J Med* 330:613-622.
71. Litt B, Esteller R, Echaz J, D'alessandro M, Short R, Henry T, Penell P, Epstein C, Bakay R, Dickter M, Vachsevanos G (2001) Epileptic seizures may begin hours in advance on clinical onset: a report of five patients. *Neuron* 30:51-64.
72. Lorez M, Benke D, Lüscher B, Möhler H, Benson JA (2000). Single-channel properties of neuronal GABA<sub>A</sub> receptor from mice lacking the  $\gamma$ 2 subunit. *J Physiol* 527:11-31.
73. Losher W, Schmidt D (1993) New drugs for the treatment of epilepsy. *Curr Op Invest Drugs* 2:1067-1095.
74. Loturco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR (1995) GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15(6):1287-1298.
75. Mares P (2009) Age- and dose-specific anticonvulsant action of bumetanide in immature rats. *Physiol Res.* 58(6):927-30.
76. Maric D, Liu QY, Maric I, Chaudry S, Chang YH, Smith SV, Sieghart W, Fritschy JM, Barker JL (2001) GABA expression dominates neuronal lineage progression in the embryonic rat neocortex and facilitates neurite outgrowth via GABA<sub>A</sub> autoreceptor/Cl<sup>-</sup> channels. *J. Neurosci.* 21:2343-2360
77. Maytal J, Shinnar, S Moshe SL, Alvarez LA (1989) Low morbidity and mortality of status epilepticus in children. *Pediatrics* 83:323-31
78. McGeer PL, McGeer EG (1989) Amino acid neurotransmitters. En: *Basic Neurochemistry* (Siegel G, Agranoff B, Albers RW, Molinoff P, eds.), 4a ed., Raven Press, New York, p.p.311-332.

79. Medina-Ceja L, Cordero-Romero A, Morales-Villagrán A (2008) Antiepileptic effect of carbenoxolone on seizures induced by 4-aminopyridine: a study in the rat hippocampus and entorhinal cortex. *Brain Res*.1187:74-81
80. Medina-Ceja L, Morales-Villagrán, Tapia R (2000) Action 4-aminopyridine on extracellular amino acids in hippocampus and entorhinal cortex: a dual microdialysis and electroencephalographic study in awake rats. *Brain Res Bull* 53(3):255-62
81. Medina-Kauwe LK, Tillakaratne NJK, Wu JY, Tobin AJ (1994) A rat brain cDNA encodes enzymatically active GABA transaminase and provides a molecular probe for GABA-catabolizing cells. *J Neurochem* 62:276-1275.
82. Mihály A, Szakács R, Bohata C, Dobó E, Krisztin-Péva B (2001) Time-dependent distribution and neuronal localization of c-fos protein in the rat hippocampus following 4-aminopyridine seizures. *Epilepsy Res* 44(2-3):97-108.
83. Mikati MA, Tarif, Lteif L, Jawad MA(2001) Time sequence and types of memory deficits after experimental status epilepticus. *Epilepsy Res*. 43, 97-101.
84. Mikati MA, Werner S, Gatt A, Liu Z, Rahmeh AA, Rachid RA, Stafsrom CE, Holmes GL (1999) Consequences of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor blockade during status epilepticus in developing brain. *Dev Brain Res* 113:139-142.
85. Monaghan DT, Bridges JR, Cotman CW (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29:365-402.
86. Morales-Villagrán A, Lopez-Perez S, Medina-Ceja L, Tapia R(1999)Cortical catecholamine changes and seizures induced by 4-aminopyridine in awake rats, studied with a dual microdialysis electrical recording technique. *Neurosci Let* 275:133-6.
87. Morales-Villagrán A, Tapia R (1996) Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo. *Neurochem Int* 28:35-40.
88. Morales-Villagrán A, Ureña-Guerrero ME, Tapia R(1996) Protection by NMDA receptor antagonist seizure induced by intracerebral administration of 4-aminopyridine. *Eur J Pharmacol* 305:87-93.
89. Niittykoski M, Nissinen J, Petonnen M, Pitkanen A (2004) Electrophysiologic changes in the lateral and basal amygdaloid nuclei in temporal lobe epilepsy: an in vitro study in epileptic rats. *Neuroscience* 124:269-281.
90. Obrietan K, van den Pol A (1999) GABA<sub>B</sub> receptor-mediated regulation of glutamate-activated calcium transients in hypothalamic and cortical neuron development. *J Neurophysiol* 82:94-102.
91. Olney JW (1971) Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J Neurophathol Exp Neurol* 30(1):75-90.
92. Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR (1996) Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J.Neurosci*:16(20):6414-23.
93. Peña F, Tapia R (1999) Relationships among seizures, extracellular amino acids changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis y electroencephalographic study. *J Neurochem* 72:2006-2014.
94. Peña F, Tapia R (2000) Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience* 101:547-61.
95. Perrault P, Avoli M (1991) Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 65:771-785.

96. Pitkanen A, Nissinen J, Nairismagi J, Lukasiuk K, Grohn OH, Miettinen R, Kauppinen R (2002). Progression of neuronal damage after status epilepticus and during spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Prog Brain Res* 135:67-83.
97. Retaux S, Julien JF, Besson MJ, Penit-Soria J (1992) Expression of GAD mRNA in GABA interneurons of the rat medial frontal cortex. *Neurosci Lett* 136:67-71.
98. Ribak CE, Roberts RC (1990) GABAergic synapses in the brain identified with antisera to GABA and its synthesizing enzyme, glutamate decarboxylase. *J Elec Microsc Tech* 15:34-48.
99. Rogawski MA, Barker JL (1983) Effects of 4-aminopyridine on calcium action potentials and calcium current under voltage clamp in spinal neurons. *Brain Res* 280(1):180-185.
100. Rogawski MA, Loshner W (2004) The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions. *Nat Med* 10:685-692.
101. Romijn HJ, Ruijter JM, Wolters PS (1988) Hypoxia preferentially destroys GABAergic neurons in developing rat neocortex explants in cultura. *Exp Neurol* 100:332-340.
102. Ronen GM, Buckley D, Penney S, Streiner DL (2007) Long-term prognosis in children with neonatal seizures: A population based study. *Neurology* 69:1816-1822.
103. Ronen GM, Penney S, Andrews W (1999) The epidemiology of clinical neonatal seizures in Newfoundland: a population-based study. *J. Pediatr* 134(1):71-75.
104. Rubio-Donnadieu F (1997) Aspectos generales y clasificación de la epilepsia. En: *Epilepsia aspectos neurobiológicos, médicos y sociales* (Feria-Velasco F, Martínez-De Muñoz D, Rubio-Donnadieu F, eds.). Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía-Departamento de Publicaciones Científicas, México, p.p.1-24.
105. Rudolph U, Möhler H (2004) Analysis of GABA receptor function and dissection of pharmacology of benzodiazepinas and general anesthetics through mouse genetics. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 44:475-498.
106. Saliba RM, Annegers JF, Waller DK, Tyson JE, Mizrahi EM (1999) Incidence of neonatal seizures in Harris County, Texas, 1992-1994. *Am J Epidemiol* 150(7):763-769.
107. Sanchez RM, Koh S, Rio C, et al. (2001). Decreased glutamate receptor 2 expression and enhanced epileptogenesis in immature rat hippocampus after perinatal hypoxia induced seizures. *J. Neurosci* ; 21(20):8154-8163.
108. Scher MS, Aso K, Beggarly ME, Hamid MY, Steppe DA, Painter MJ (1993) Electrographic seizures in preterm and full-term neonates: clinical correlates, associated brain lesions, and risk for neurologic sequelae. *Pediatrics*. 91,128-134.
109. Schoepp DD, Conn PJ (1993) Review: Neurotransmitter receptors II. AMPA and Kainate Receptors. *Neuropharmacology* 34:123:139.
110. Schousboe A, Sarup A, Bak LK, Waagepetersen HS, Larsson OM (2004) Role astrocytic transport processes in glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem Int* 45:521-527.
111. Simeone TA, Sanchez RM, Rho JM (2004) Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in mammalian central nervous system. *J Child Neurol* 19:343-360.
112. Sitges M, Chiu LM, Gonzalez L (1993) Vesicular and carrier-mediated depolarization induced release of [<sup>3</sup>H]-GABA: inhibition by amiloride and verapamil. *Neurochem Res* 18:1081-1087.
113. Solis-Ortiz H, Arauz-Contreras J (1989) Modelos experimentales de epilepsia. En: *Epilepsia. Un enfoque multidisciplinario* (Feria-Velasco A, Martínez-de Muñoz D, Rubio-Donnadieu F, eds.), 2ª. ed., Trillas, México, p.p.74-97.
114. Staley KJ, Soldo BL, Proctor WR (1995) Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA<sub>A</sub> receptors. *Science* 269:977-981.

115. Stallcup WB, Bulloch K, Baetge EE (1979) Coupled transport of glutamate and sodium in cerebellar nerve cell line. *J Neurochem* 32:57-65.
116. Sulaimana SAJ, Sulimana FEO, Barghouthib S (2003) Kinetic studies on the inhibition of GABA-T by  $\gamma$ -vinyl-GABA and taurine. *J Enzyme Inhib Med Chem* 18:297-301.
117. Swann JW, Moshé SL (1997) Developmental issues in animal models. In: Engel J Jr, Pedley TA, eds. *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia. Lippicott-Raven Publishers, 467-80.
118. Takagaky G, Konagaya H (1985) Properties of the uptake and release of neurotransmitter glutamate in cerebral cortical tissue of guinea pigs. *Neurochem Res* 10:1059-1069.
119. Takashima S, Chan F, Becker LE, Armstrong DL (1980) Morphology of developing visual cortex of the human infant: a quantitative Golgi study. *J Neuropathol Exp Neurol* 39(4):487-501.
120. Talos DM, Fishman RE, Park H, Folkerth RD, Follett PL, Volpe JJ, Jensen FE (2006) Developmental regulation of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor subunit expression in forebrain and relationship to regional susceptibility to hypoxic/ischemic injury. I. Rodent cerebral white matter and cortex. *J Comp Neurol* 497(1):42-60.
121. Tapia R (1983) El ácido  $\gamma$ -aminobutírico. En: *Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas* (Pasantés-Morales H, Aréchiga H, eds.), UNAM, México. p.p. 57-70.
122. Tapia R, Sitges M (1982) Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res* 250:291-299.
123. Taratara A, Manni R, Galimberti CA, Mumford JP, Ludice A, Perucca E (1989) Vigabatrin in the treatment of epilepsy: a long-term follow-up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 52:467-471.
124. Thesleff S (1980) Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience* 5:1413-1419.
125. Ureña-Guerrero ME, Gutiérrez-Reyes CM, Murguía-Castillo J, Rivera-Cervantes MC, Beaz-Zarate C, Feria-Velasco AI (2010) Los niveles de expresión hipocámpales y entorrinales de la proteína NKCC1 son acordes a la severidad de las crisis inducidas por 4-aminopiridina durante el desarrollo postnatal temprano de la rata macho. *Memorias del 6° Congreso Latinoamericano de Epilepsia*.
126. Vakili A, Tayebi K, Jafari MR, Zarrindast MR, Djahangiri B (2004) Effect of ethanol on morphine state-dependent learning in the mouse: involvement of GABAergic, opioidergic and cholinergic systems. *Alcohol Alcohol* 39(5):427-32.
127. Van Bogaert PP, Snyders DJ (1982) Effects of 4-aminopyridine on inward rectifying and pacemaker currents of cardiac Purkinje fibers. *Eur J Physiol* 349:230-238.
128. Versteeg DH, Heemskerk FM, Spierenburg HA, de Graan PN, Schrama LH (1995) 4-Aminopyridine differentially affects the spontaneous release of radiolabelled transmitters from rat brain slices in vitro. *Brain Res* 686:233-238.
129. Világi I, Dobó E, Borbély S, Czégé D, Molnár E, Mihály A (2009) Repeated 4-aminopyridine induced seizures diminish the efficacy of glutamatergic transmission in the neocortex. *Exp Neurol* 219(1):136-45.
130. Wade JV, Samson FE, Nelson SR, Pazdernik TL (1987) Changes in extracellular amino acids during soman-and kainic acid-induced seizures. *J Neurochem* 49:645-650.
131. Wang YF, Gao XB, van den Pol AN (2001) Membrana properties underlying patterns of GABA dependent action potentials in developing mouse hypothalamic neurons. *J Neurophysiol* 86, 1252-1265.
132. Watkins JC, Overman H (1987) Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. *Trends Neurosci* 10:265-272.



133. Wong HK, Liu XB, Matos MF, Chan SF, Perez-Otaño I, Boysen M, Cui J, Nakanishi N, Trimmer JS, Jones EG, Lipton SA, Sucher NJ (2002) Temporal and regional expression of NMDA receptor subunit NR3A in the mammalian brain. *J Comp Neurol* 450(4):303-317.
134. Wu JY (1983) Immunocytochemical identification of GABAergic neuron and pathways. En: *Glutamine, glutamate y GABA in Central Nervous System* (Hertz L, Kvamme E, McGeer EG, Schousboe A, eds.), Liss, New York, p.p.161-176.
135. Ye J (2000) Physiology and pharmacology of native glycine receptors in developing rat ventral tegmental area neurons. *Brain Res.* 862,74-82.
136. Yusta AI (2005) Crisis convulsivas. Concepto, clasificación y etiología. *Emergencias* 17:S68-73.
137. Yuste R, Katz LC (1991) Control of postsynaptic  $Ca^{2+}$  influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron* 6, 333-344.
138. Zhu XM, Ong WY (2004) changes in GABA transporters in the rat hippocampus after kainite induced neuronal injury: decrease in GAT-1 and GAT-3 but up regulation of betaine/GABA transporter BGT-1. *J Neurosci Res* 77:402-409.
139. López-Perez SJ, Ureña-Guerrero ME, Morales-Villagrán A (2009) Monosodium glutamate neonatal treatment as a seizure and excitotoxic model. *Brain Res* 1317:246-256.
140. Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M (2001) GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 105(4):521-32.
141. Talos DM, Fishman RE, Park H, Folkert RD, Follett PL, Volpe JJ, Jensen FE (2006) Developmental regulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor subunit expression in forebrain and relationship to regional susceptibility to hypoxic/ischemic injury. I. Rodent cerebral white matter and cortex. *J Comp Neurol* 497(1):42-60.

TESIS/CUCBA