

---

---

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

---

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AGROPECUARIAS  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**



**EFFECTOS DIFERENCIALES DE LA TRIMETILAMINA Y LA  
QUININA SOBRE LA ACTIVIDAD EPILEPTIFORME INDUCIDA  
POR LA 4-AMINOPIRIDINA EN LA CORTEZA ENTORRINAL  
DE RATAS EN LIBRE MOVIMIENTO**

---

---

TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD DE

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

**CONSUELO VENTURA MEJIA**

---

---



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**  
*Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología*

1293/ C. C. BIOLÓGÍA

C. Consuelo Ventura Mejía

**PRESENTE**

Manifestamos 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: **“Efectos diferenciales de la trimetilamina y la quinina sobre la actividad epileptiforme inducida por la 4-aminopiridina en la corteza entorrinal de ratas en libre movimiento”** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el/la: **Dra. Laura Guadalupe Medina Ceja**.

Sin más por el momento, le envío un afectuoso saludo.

**ATENTAMENTE**

**“PIENSA Y TRABAJA”**

Las Agujas, Zapopan., 14 de febrero del 2008.

**DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

**M en C. GLORIA PARADA BARRERA**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

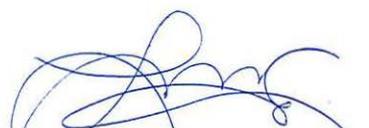
Dr. Fco. Martín Huerta Martínez.  
 Presidente del Comité de Titulación.  
 Licenciatura en Biología.  
 CUCBA.  
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis e Informes, opción Tesis, con el título: *"Efectos diferenciales de la Trimetilamina y la Quinina sobre la actividad epileptiforme inducida por la 4-Aminopiridina en la corteza entorrinal de ratas en libre movimiento"* que realizó la pasante *Consuelo Ventura Mejía* con número de código *B02007126* 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 a 06 de mayo de 2008.



Dra. Laura Guadalupe Medina Ceja  
 Director/a del trabajo,

VoBo

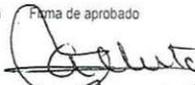


Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación

Firma de aprobado

Fecha de aprobación

Dr. Alberto Morales Villagrán



6/05/08

Dr. Jacinto Bañuelos Pineda



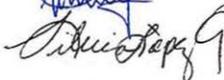
4 Mayo 2008

Dr. Sergio Meneses Ortega  
 Supl.



6 Mayo 2008

Dr. Silvia Josefina López Pérez



6/05/08

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco en especial a la Dra. Laura Gpe. Medina Ceja por su incondicional apoyo y confianza que me brindo durante todo el desarrollo de mi carrera.

Agradezco a mis amigos por el apoyo que me dieron al llegar a Guadalajara en los primeros semestres.

A mi familia por estar siempre conmigo a lo largo de mis estudios.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo en especial a mis **padres**:

Gracias por darme la vida y confiar en mí, apoyarme en todas mis decisiones y darme la oportunidad de salir adelante. Este trabajo no solo se lo dedico sino que también es de ustedes pues sin ustedes esto no podría ser posible, los quiero mucho.

GRACIAS POR SER MIS PADRES.

A mi nina Celia por estar con migo a lo largo de toda mi carrera, por aguantar mis malos ratos y desvelarse con migo en todos mis trabajos, GRACIAS NINA por sus consejos y su tiempo.

A mi novio José Roberto por estar en los momentos desesperantes y estresantes y siempre darme tu apoyo a pesar de todo GRACIAS TE QUIERO.

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Epilepsia	1
1.2 Modelo de 4-Aminopiridina	4
1.3 Circuito Corteza-Entorrinal-Hipocampo	8
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>10</b>
2.1 Uniones Comunicantes y acoplamiento eléctrico en el Sistema Nervioso Central.	10
2.2 Uniones Comunicantes y Epilepsia.	15
2.3 Abridores y Bloqueadores de las Uniones Comunicantes: Trimetilamina y Quinina.	17
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>20</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>20</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b>	<b>21</b>
<b>6. OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>22</b>
7.1 Cirugías	22
7.2 Administración de drogas	22
7.3 Registro EEG y conducta	23
7.4 Evaluación histológica	24
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>26</b>
8.1 Efecto de la Trimetilamina sobre la actividad epileptiforme en la corteza entorrinal y la región CA1 de hipocampo	26
8.2 Efecto de la Quinina sobre la actividad epileptiforme en la corteza entorrinal y la región CA1 de hipocampo	33
8.3 Efecto de la Trimetilamina y la Quinina sobre la conducta convulsiva	37
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>40</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>46</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUCCIÓN:

### 1.1 Epilepsia.

La epilepsia es un síndrome de disfunción cerebral, de carácter recurrente que se caracteriza por la descarga sostenida y anormalmente sincrónica de un grupo de neuronas cerebrales. Típicamente la epilepsia se origina en redes neuronales que bajo condiciones normales generan oscilaciones sincrónicas locales o de larga distancia. Asimismo, se considera que la actividad epiléptica es el resultado de un desequilibrio entre la actividad excitadora que lleva a una despolarización de la neurona por incremento del neurotransmisor glutamato (glu), y la inhibidora que genera una hiperpolarización debido a una disminución del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Rowley y col., 1995; Tapia y col., 1999; Medina-Ceja y col., 2000).

La patogénesis de la epilepsia está asociada a una estimulación anormal que ocurre en una cierta región del cerebro, causando despolarización de la membrana y que se expande a las células circundantes. Una característica electroencefalográfica (EEG) de la epilepsia es la descarga interictal punta-onda, la cual refleja eventos anormales de despolarización e hiperpolarización de la membrana, que ocurren sincrónicamente en muchas neuronas de la región epileptogénica; la espiga en el EEG está formada por la suma de despolarizaciones paroxísticas, mientras que la onda lenta está formada por la suma de potenciales inhibidores (Engel, 1995).

#### *Clasificación.*

La clasificación actual fue propuesta por la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE, 1981) que describe 2 grupos principales y un tercer grupo de convulsiones no clasificadas (tabla 1). Las crisis parciales o focales donde la descarga excesiva se restringe a un área específica del cerebro y las manifestaciones clínicas dependen de la representación funcional de esta área. Cuando una crisis parcial no produce alteración de la conciencia se denomina crisis parcial simple, si la conciencia está alterada se denomina crisis parcial compleja. Las crisis generalizadas que involucran a todo el cerebro y cuya principal manifestación son las convulsiones generalizadas, pueden ser de 6 tipos:

- Crisis de ausencia: que suelen presentarse durante la niñez y adolescencia, con una pérdida momentánea de la conciencia y un complejo electroencefalográfico punta-onda característico de 3 Hz.
- Las crisis mioclónicas: que suelen iniciar en la adolescencia y se caracterizan por movimientos súbitos arrítmicos y simétricos de las extremidades, son de corta duración y con un patrón electroencefalográfico de poli punta onda.
- Las crisis tónicas, clónicas y tónico-clónicas: tienen inicio en la niñez y adolescencia, pero también en edad más avanzada, se caracterizan por extensión tónica de extremidades o sacudidas rítmicas, o ambos, usualmente se acompañan de pérdida del estado de alerta y confusión posictal, estas pueden ser primarias o secundarias cuando siguen a una crisis parcial, el patrón electroencefalográfico es del tipo punta-onda o poli puntas.
- Las crisis atónicas: diferentes a las anteriores por las caídas súbitas como consecuencia de la pérdida del tono muscular.

Las manifestaciones clínicas de la epilepsia son muy variadas, dependiendo del área cortical involucrada. Las crisis epilépticas son autolimitadas, se manifiestan por periodos de uno a dos minutos y pueden ser seguidas de un periodo variable de depresión cerebral que se manifiesta por un déficit neurológico localizado (pérdida de fuerza, parálisis) o difuso (somnolencia, cansancio, agitación, delirios, cefalea) (Yusta, 2005; Mattson, 2003).

**Tabla 1.** Clasificación de las crisis epilépticas propuestas por la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE 1981).

**1. Crisis parciales o focales.**

- 1.A. Crisis parciales simples:
  - 1.A.1. Con signos motores.
  - 1.A.2. Con síntomas somatomotores o sensoriales especiales.
  - 1.A.3. Con signos o síntomas autonómicos.
  - 1.A.4. Con síntomas psíquicos.
- 1.B. Crisis parciales complejas.
  - 1.B.1 Crisis parciales simples seguidas de alteración de la conciencia.
  - 1.B.2. Con empeoramiento de la conciencia desde el inicio.
- 1.C. Crisis parciales con evolución secundaria hacia crisis generalizadas.
  - 1.C.1 Crisis parciales simples que evolucionan a crisis generalizadas.
  - 1.C.2 Crisis parciales complejas que evolucionan a crisis generalizadas.
  - 1.C.3. Crisis parciales simples que evolucionan a crisis parciales complejas y después a crisis generalizadas.

**2. Crisis generalizadas (convulsivas y no convulsivas).**

- 2.A. Crisis de ausencia.
  - 2.A.1. Ausencias típicas
  - 2.A.2. Ausencias atípicas.
- 2.B. Crisis mioclónicas.
- 2.C. Crisis clónicas.
- 2.D. Crisis tónicas.
- 2.E. Crisis tónico-clónicas.
- 2.F. Crisis atónicas (crisis astáticas).

**3. Crisis epilépticas inclasificables.**

Respecto al origen, las epilepsias se dividen en 2 grandes grupos: las idiopáticas a las cuales se les puede atribuir un origen genético, y las sintomáticas que se consideran adquiridas y en donde es posible reconocer un factor causante (Berkovics y Scheffer, 2001).

La epilepsia del lóbulo temporal es la más frecuente y resistente a fármacos. Clásicamente se ha pensado que el hipocampo es la estructura más importante en la generación de descargas en la epilepsia del lóbulo temporal, sin embargo, existe evidencia de que otras estructuras también participan, como el caso particular de la corteza entorrinal (CE), ya que presenta extensas conexiones recíprocas entre la propia CE, el hipocampo y otras áreas cerebrales, lo que la hacen un candidato potencial para la generación y propagación de descargas en este tipo de epilepsia (Bartolomei y col., 2005). Se ha sugerido que las capas profundas de la CE son las responsables del inicio de la actividad epileptiforme, a este respecto existe evidencia donde se ha encontrado pérdida neuronal en la capa III de la CE, tanto en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, como en el modelo animal de este tipo de epilepsia (Fountain y col., 1998; Tolner y col., 2005).

Para estudiar los mecanismos básicos de inducción, mantenimiento y extinción de las crisis epileptiformes, se emplean en gran medida modelos animales que presentan algunas de las características de la epilepsia. Estos modelos pueden ser agudos o crónicos. Los modelos agudos generalmente utilizan la aplicación de drogas a nivel intracerebral como el caso de la bicuculina o la 4-AP y se les considera como modelos convulsivos más que de epilepsia. Por su parte, los modelos crónicos cambian la estructura y función de regiones cerebrales, condición que incrementa la susceptibilidad a las crisis, presentando descargas epileptiformes recurrentes sin la presencia del estímulo que las generó, como el caso del kindling eléctrico o químico (Dudek y col., 1998; Jefferys, 2003).

## **1.2 Modelo de 4-Aminopiridina.**

La 4-aminopiridina (4-AP) es una droga que cuando se administra por vía intraperitoneal (i.p.) o intracerebral (i.c.) es capaz de inducir crisis convulsivas en diferentes especies de animales (Spyker y col., 1980; Pasantes-

Morales y Arzate, 1981; Tapia y Sitges, 1982; Glover, 1982; Pasantes-Morales y col., 1987; Mihaly y col., 1990). El patrón de crisis convulsivas inducido por la administración i.p. de 4-AP en la rata, es muy similar al que se produce por la administración i.c. de ácido kainico (Ben-Ari, 1985). Este tipo de crisis se caracterizan por la aparición de un período convulsivo largo, con una etapa inicial de hiperexcitación, seguido de convulsiones clónicas, tónico-clónicas y muerte durante una convulsión tónica en algunos casos, mientras que los animales que sobreviven presentan movimientos clónicos alternados frecuentemente con contracciones tónicas de mediana intensidad (Fragoso-Veloz y col., 1990). De manera similar, la 4-AP ejerce un efecto convulsivante cuando se administra i.c., ya sea en el hipocampo (Fragoso-Veloz y col., 1990; Medina-Ceja y col. 2000) o en el ventrículo cerebral lateral de la rata (Gandolfo y col., 1989).

Los estudios *in vitro* han permitido observar que el efecto de la 4-AP sobre la liberación de neurotransmisores es de espectro amplio, es decir, independientemente de la sustancia mediadora, tipo de sinapsis o especie (Thesleff, 1980). Mediante estudios electrofisiológicos se ha demostrado que la 4-AP bloquea la corriente transitoria de  $K^+$  ( $I_A$ ) y de inactivación lenta ( $I_D$ ), lo cual conduce a una prolongación del potencial de acción a través de un retardo en la fase de repolarización del potencial de acción, fenómeno que mantiene abiertos los canales de  $Ca^{++}$  sensibles al voltaje (Rogawski y Barker, 1983), lo que podría explicar la inducción del aumento en la liberación de neurotransmisores (Fig. 1). Sin embargo, otras evidencias demuestran que la 4-AP aumenta también la corriente de  $Ca^{++}$  (Agoston y col., 1983; Gibson y Manger, 1988).

En trabajos realizados por Morales-Villagrán y Tapia (1996) se demostró que infusiones de 4-AP a través de cánulas de microdiálisis en el núcleo caudado, inducen crisis convulsivas y una liberación notable de glutamato significativamente más alta que la de los demás aminoácidos evaluados. Además, las alteraciones motoras producidas por la 4-AP se bloquean por antagonistas del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (Morales-Villagrán y col., 1996). Trabajos realizados en el laboratorio (Morales-Villagrán y col., 1999) han demostrado, con la técnica de microdiálisis dual y registro electroencefalográfico simultáneo en ratas despiertas, que la infusión de 4-AP

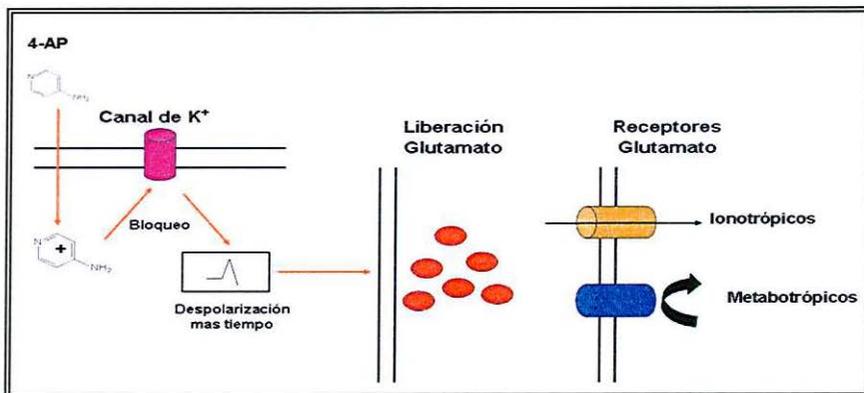
en la corteza motora produce convulsiones intensas y crisis electroencefalográficas tanto en la corteza motora infundida como en la contralateral en la que solo se administra medio Ringer normal. Esta acción convulsivante se acompaña de un incremento extracelular en la concentración de dopamina (15 veces), norepinefrina (2.4 veces) y ácido vanil mandélico (1.8 veces) en la corteza motora infundida.

#### *Bloqueo de canales de potasio.*

El papel de los canales de  $K^+$  en el control del potencial de membrana y la excitabilidad de las neuronas esta bien establecido (Hille, 1984). Las membranas de las neuronas presentan varios subtipos de los canales de  $K^+$  que participan de diversas maneras en las propiedades de conductancia eléctrica de las neuronas (Rogawski, 1985). La actividad del canal de  $K^+$  participa en el control de la liberación del neurotransmisor de las terminales nerviosas determinando el curso temporal de la repolarización. El bloqueo de los canales de  $K^+$  puede prolongar la duración de los potenciales de acción, lo que favorece el retardo en el cierre de los canales de  $Ca^{++}$ , incrementando la entrada de este catión y la liberación del neurotransmisor. Existen varios bloqueadores del canal de  $K^+$ , como la 4-AP, el tetraetilamonio (TEA) y la quinina o toxinas naturales como la dendrotoxina, caribdotoxina y apamina. Se ha demostrado que en rebanadas de cerebro y en sinaptosomas estos bloqueadores incrementan la liberación *in vitro*, de la acetilcolina (ACh), el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), el glu, la noradrenalina y la dopamina (Hu y col., 1991; Jin y Fredholm, 1994; Tapia y Sitges, 1982; Tapia y col., 1985). Algunos estudios *in vitro* han demostrado que en particular el efecto de la 4-AP sobre la liberación de neurotransmisores es de espectro amplio, independientemente de la sustancia mediadora, tipo de sinapsis o especie (Thesleff, 1980).

Se sabe que la 4-AP bloquea los canales de  $K^+$  activados por voltaje en una gran variedad de células, incluyendo las neuronas, el músculo cardíaco, músculo esquelético y liso (kenyon y Gibbons, 1979; Gillespie y Hunter, 1975; Hara y col., 1980). La 4-AP actúa en el lado citoplásmico de los canales de  $K^+$  (Kirsch y Drewe, 1993), pero el mecanismo del bloqueo aún no se ha caracterizado completamente. Al respecto algunos estudios han postulado que la 4-AP se une preferencialmente al estado abierto de los canales rectificadores

de  $K^+$  (Kirsch y col., 1993). En el trabajo de Russell y col. (1994) han observado que el bloqueo de la 4-AP del canal de  $K^+$  Kv 1.2 ocurre solo después de la activación de la corriente, debido probablemente a que el sitio al cual se une la 4-AP no es accesible cuando el canal está cerrado. En otros estudios se ha obtenido resultados similares en canales de  $K^+$  tipo Kv 2.1 y Kv 3.1 (Kirsch y Drewe, 1993). Trabajos de Bouchard y Fedida (1995) han encontrado que la 4-AP suprime la corriente saliente al unirse al canal de  $K^+$  tipo Kv 1.5 en la superficie interna de la membrana. La unión y la disociación de la 4-AP del canal requieren del estado abierto, aunque se puede unir a diferentes sitios de este canal en el estado abierto o cerrado, modulando la transición aparente del canal del estado final cerrado al estado abierto. Asimismo, se ha encontrado que la 4-AP mueve aproximadamente un 20% el potencial de membrana eléctrico para alcanzar su sitio de unión. Por otro lado, la profundidad a la cual la 4-AP se une al canal de  $K^+$ , aumenta cuando la concentración de la 4-AP se incrementa (Bouchard y Fedida, 1995).

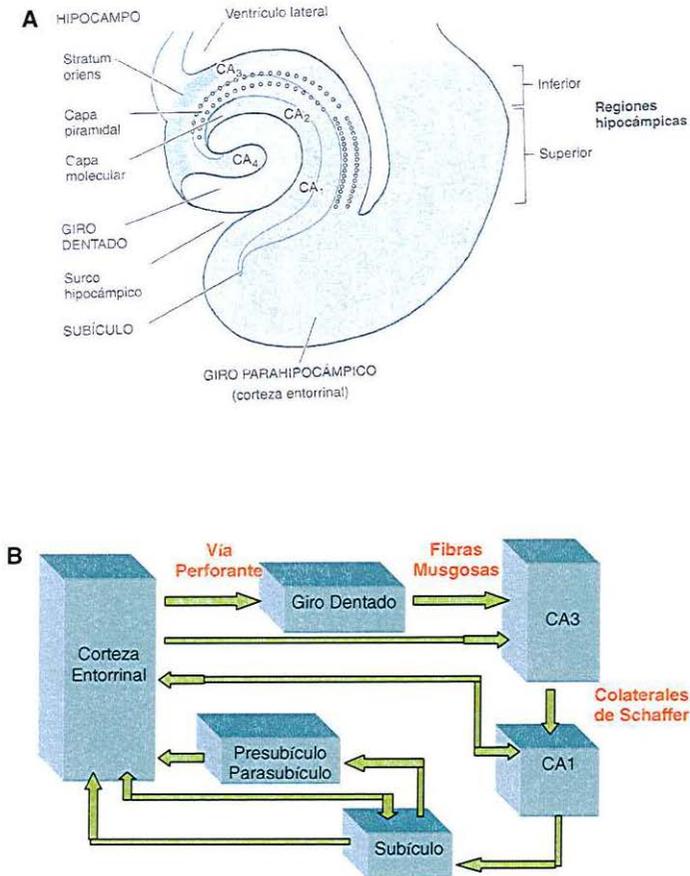


**Fig. 1** Mecanismo de acción de la 4-Aminopiridina (4-AP). Bloquea los canales de potasio, retardando la fase de repolarización y mantiene por más tiempo la despolarización, lo que conduce a la liberación de neurotransmisores, particularmente glutamato en el hipocampo. El glutamato liberado sobre activa receptores postsinápticos ionotrópicos y metabotrópicos lo que favorece la actividad epileptiforme (Medina-Ceja y col., 2000, 2008).

### 1.3 Circuito Corteza Entorrinal-Hipocampo.

#### *Características generales.*

La formación hipocámpica es una estructura elongada, cuyo eje longitudinal se extiende en forma de C y corre rostródorsalmente del núcleo septal hasta caudoventralmente en el lóbulo temporal. La formación hipocámpica comprende tres regiones citoarquitectónicamente distintas: el giro dentado, el complejo subicular y el hipocampo propiamente dicho (que comprende las regiones *cornu ammonis* 1 (CA1), 2 (CA2) y 3 (CA3) (Fig. 2A). Las tres regiones de la formación hipocámpica comparten la apariencia característica trilaminar que las define como alo-corteza. El giro dentado es el blanco de la vía perforante formada por axones originados en las capas III y IV de la corteza entorrinal (CE), y es el primer paso del circuito trisináptico intrahipocámpal. El siguiente paso es la proyección de las fibras musgosas de las neuronas granulares del giro dentado a la región CA3, en donde forman sinapsis con las dendritas proximales de las células piramidales de esta región, las cuales interaccionan entre sí. El tercer paso del circuito está representado por axones de las células piramidales de CA3, las cuales forman colaterales de Schaffer que se proyectan a la región CA1 (Fig. 2B). Las células piramidales en esta última región forman el *stratum pyramidale*; sus dendritas apicales terminan en el *estratum lacunosum moleculare*, mientras que sus dendritas basales están dentro del *stratum oriens* (Steriade, 2003). El nombre de complejo subicular lo utilizan diversos autores para denominar a un grupo de pequeñas regiones citoarquitectónicamente diferentes que se encuentran localizadas entre la región CA1 y la corteza entorrinal, y que incluye a las siguientes tres estructuras: el presubículo, el subículo y el parasubículo; la región del subículo había permanecido inexplorada, hasta que se descubrió que es la región de origen del fornix; el subículo tiene estructura trilaminar, mientras que las otras dos regiones tienen una estructura multilaminar.



**Fig. 2.** A) Representación esquemática de la formación hipocámpica y los sub-campos CA3, CA2 y CA1 del hipocampo (Afifi y Bergman, 2005). B) Esquema principal del circuito trisináptico del hipocampo y su relación con otras regiones de la formación hipocámpica (conectividad direccional y bidireccional) (Afifi y Bergman, 2005, Danglot y col., 2006).

Ramón y Cajal dividió primero el hipocampo en 2 regiones mayores, región inferior y región superior, sin embargo, la terminología de Lorente de Nó ha adquirido mayor uso, él dividió el hipocampo en 3 regiones: CA3, CA2 y CA1. Además de la diferencia en el tamaño de las células piramidales de CA3 y CA1, hay una clara separación de sus conexiones, las células piramidales de CA3 reciben aferencia de las fibras musgosas del giro dentado, mientras que las células piramidales de CA1 no. La región de CA2 ha sido objeto de controversia por ser una zona interpuesta entre CA3 y CA1 y semeja ser una porción terminal de CA3.

#### *Tipos celulares del circuito.*

La organización laminar es igual para las 3 regiones del hipocampo, la principal capa celular es la de las células piramidales, la más profunda es una capa casi libre de células denominado *stratum oriens* y por debajo de esta el alveus; en CA3 pero no en otras regiones, una delgada capa por encima de la de células piramidales contiene a los axones de las fibras musgosas del giro dentado, esta capa se denomina *stratum lucidum*; superficial al *stratum lucidum* en CA3, e inmediatamente superior a la capa de células piramidales en CA2 y CA1, se encuentra el *stratum radiatum*. Finalmente la capa mas superficial del hipocampo se denomina *stratum lacunosum moleculare*, y es en esta capa donde viajan y terminan las fibras de la vía perforante originadas en la CE.

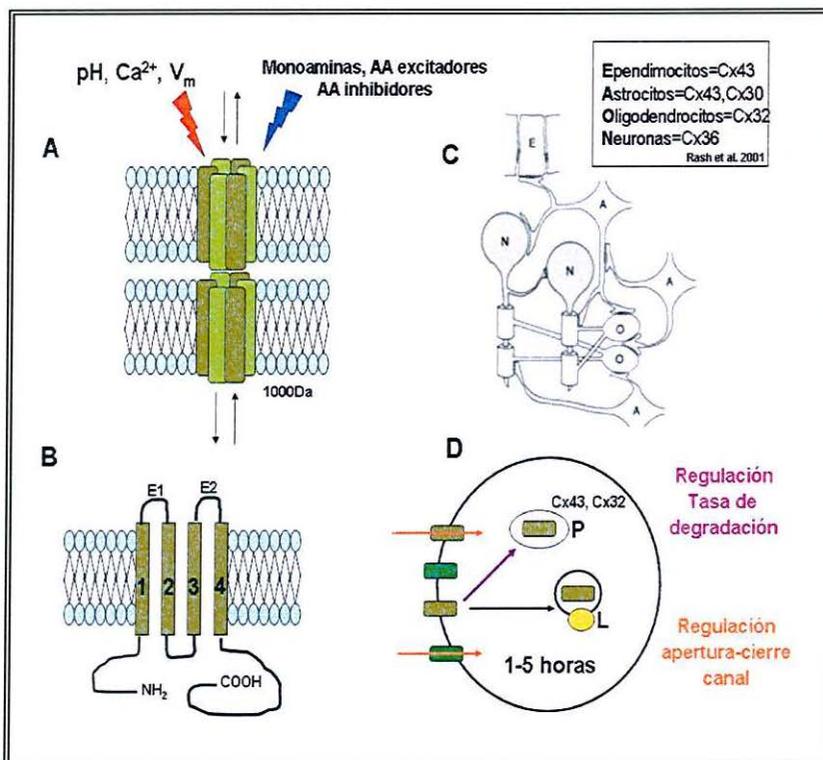
Las principales células del hipocampo son las células piramidales. Además de las células piramidales, hay una población heterogénea de células en canasta de diversos tamaños y apariencia, cuyos cuerpos celulares se encuentran también en la capa de células piramidales; los axones de las células en canasta se extienden transversalmente e inervan los cuerpos celulares de las células piramidales hipocámpicas.

## **2. ANTECEDENTES:**

### **2.1 Uniones Comunicantes y acoplamiento eléctrico en el Sistema Nervioso Central.**

Las uniones comunicantes, que son el correlato anatómico de las sinapsis eléctricas, contribuyen al acoplamiento eléctrico entre las células del Sistema Nervioso, se definen como especializaciones de membrana, formadas

por la unión de dos hemicanales, conocidos como conexones, cada uno de los cuales consiste de 6 subunidades proteicas llamadas conexinas (Cx seguido de un número que designa el peso molecular de cada una). Cada Cx presenta 4 dominios transmembranales, dos asas externas y una interna, las regiones carboxilo y amino terminal se localizan en el interior de la célula (Kumar y Gilula, 1996). Las diferencias en el peso molecular de las conexinas se deben a las diferencias en la longitud de la región carboxilo terminal. Las conexinas se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso donde se pliegan y se insertan en vesículas para dirigirse al Aparato de Golgi, donde se oligomerizan para conformar los hemicanales o conexones, posteriormente son transportados a través de estructuras conformadas por microtúbulos a la membrana plasmática donde se asocia con otro hemicanal de la célula vecina formando el canal completo de la unión comunicante. Las conexinas tienen una vida media promedio de 1-5 horas y se pueden degradar por dos vías, la del lisosoma y predominantemente la del proteosoma (Musil y Goodenough, 1993; Musil y Goodenough, 1995; Falk, 2000). Estas uniones comunicantes se localizan en las membranas de dos células en aposición, las cuales pueden ser neurona-neurona, neurona-glía o glía-glía. Las conexinas constituyen una familia de proteínas homólogas que son codificadas por diferentes genes (Rouach y col. 2002). En la actualidad se han encontrado 16 conexinas diferentes en los mamíferos, de las cuales al menos la Cx26, Cx32, Cx36, Cx43 y Cx47 se expresan en el hipocampo de roedores (Venance y col. 2000; Teubner y col. 2001). En las células gliales como los astrocitos se ha encontrado una alta expresión de las conexinas Cx26, Cx30 y Cx43, mientras que para los oligodendrocitos las conexinas más abundantes son Cx29, Cx32 y Cx47; en cambio la Cx36 se expresa de manera extensa y exclusiva en las neuronas (Fig. 3) (Connors y col. 2004).

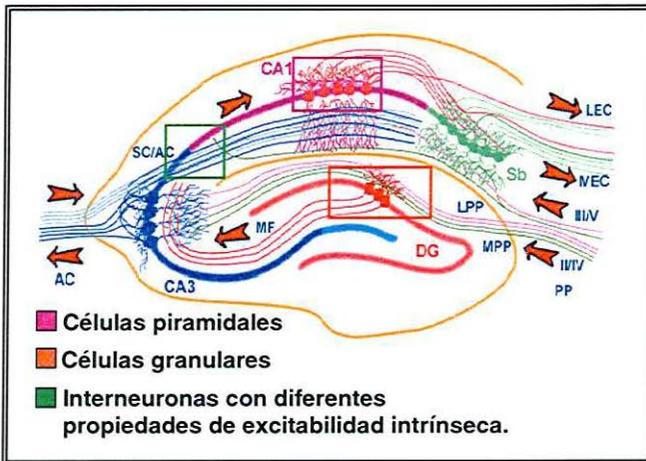


**Fig. 3.** Correlato anatómico de las sinapsis eléctricas, las Uniones Comunicantes: A) La unión de dos hemicanales o conexones conforman un canal que atraviesa las dos células en aposición (uniones comunicantes). Esta estructura se ve afectada por varios factores externos e internos. B) Cada conexon esta conformado por seis conexinas y cada conexina tiene 4 dominios transmembranales, dos asas externas (E1 y E2) y las dos regiones amino y carboxilo terminal se encuentran en el citoplasma. C) Los diferentes tipos celulares del Sistema Nervioso expresan diferentes conexinas (Tomado de Rash y col., 2001). D) El recambio de las conexinas es rápido oscila entre 1 a 5 horas y su regulación puede incrementar la comunicación intercelular al igual que la apertura de los canales, abreviaciones P proteosoma, L lisosoma.

Con respecto a la función que pueden desempeñar las uniones comunicantes en las células gliales, se ha encontrado que participan en la disipación de iones de potasio, la regulación del volumen celular, el control de la proliferación celular, así como en la propagación de ondas de calcio a través de los astrocitos. En los oligodendrocitos se ha observado la presencia de uniones comunicantes que establecen puentes de comunicación con los astrocitos, permitiendo su acoplamiento metabólico (Mugnaini, 1986; Pastor y col. 1998; Rash y col. 1997; Rash y col. 2001). Las uniones comunicantes permiten el acoplamiento eléctrico bidireccional entre las células del Sistema Nervioso, propiedad que permite la sincronización de la actividad eléctrica entre las mismas y la propagación de la despolarización (excitación) o la hiperpolarización (inhibición) a través de una red neuronal determinada (Spray y col. 1999). En este sentido, las sinápsis eléctricas pueden contribuir en varias propiedades funcionales de una red neuronal, como son: la sincronización de las espigas u oscilaciones de la propia red neuronal y la coordinación como el reforzamiento de los potenciales inhibidores postsinápticos (Fricker y Miles, 2001; Galarreta y Hestrin, 2001; Spruston, 2001). Asimismo, se ha encontrado que factores externos como internos pueden regular el acoplamiento eléctrico. A este respecto, se ha demostrado que las monoaminas como los aminoácidos excitadores e inhibidores regulan el acoplamiento entre las neuronas y los astrocitos, a través de sistemas de señalización mediados por segundos mensajeros o proteínas cinasas (Rouach y col. 2002). Otros factores que participan en la regulación del acoplamiento eléctrico son el pH y la concentración de calcio intracelular, ya que el incremento en ambos disminuye la conductancia de las uniones comunicantes; algunos fármacos como el heptanol, el octanol y el anestésico volátil halotano, así como la oleamida, la anandamida, el ácido araquidónico, la carbenoxolona y la quinina, son capaces de provocar el cierre de las uniones comunicantes e incluso algunos de ellos lo hacen de manera exclusiva a un tipo de conexina (Connors y col. 2004).

Existe evidencia experimental que sugiere que las células piramidales y las células granulares del hipocampo se encuentran acopladas eléctricamente a través de uniones comunicantes (Dudek y col. 1983, 1986, 1998). A este respecto, estudios de registro intracelular con óptica de contraste de

interferencia e iluminación diferencial infrarroja (siglas en inglés IR-DIC) han encontrado acoplamiento electrotónico en las células piramidales de CA1 a través de sus uniones comunicantes axonales (Schmitz y col. 2001). Con base en evidencia electrofisiológica y farmacológica obtenida de registros intracelulares simples y múltiples, Zsiros y Maccaferri (2005) no solo han confirmado la existencia de acoplamiento eléctrico entre las interneuronas del hipocampo sino que también se presenta en interneuronas con diferentes propiedades de excitabilidad intrínseca (Fig. 4).



**Fig. 4.** Evidencia experimental ha demostrado la presencia de acoplamiento electrotónico a través de las sinapsis eléctricas en el hipocampo y giro dentado (Dudek y col. 1983, 1986, 1998; Schmitz y col. 2001; Zsiros y Maccaferri 2005)

De igual manera se ha encontrado en otras regiones como la retina y la corteza somatosensorial la presencia de sinapsis eléctricas homólogas y heterólogas, en relación a la presencia de las mismas entre células del mismo tipo celular o diferente, respectivamente (Simon y col. 2005). En el caso de la retina, el acoplamiento eléctrico entre los conos y bastones permite la sumatoria de entradas de diferentes células y mejora la resolución de la señal reduciendo el ruido (Demb y Pugh, 2002, Sohl y col. 2005). En la corteza, en cambio, las sinapsis eléctricas heterólogas se presentan en particular en las interneuronas denominadas neurogliales (células en canasta, células con

espigas regulares, células axo-axónicas), que permite monitorear la actividad de éstas en varias regiones de sus células blanco (Simon y col. 2005). Por lo anterior, podríamos considerar una función similar en el caso de las sinapsis eléctricas heterólogas que se encuentran en la región del hipocampo, aunque para ello es necesario realizar estudios electrofisiológicos, farmacológicos y anatómicos más detallados.

## **2.2 Epilepsia y Uniones Comunicantes.**

Se ha demostrado mediante trabajos *in vitro*, que la actividad epileptiforme se puede presentar aún en ausencia de la neurotransmisión sináptica clásica (Taylor y Dudek, 1982; Pérez Velásquez y Carlen, 2000). Entre los diferentes mecanismos posibles no sinápticos que participan en la sincronización de las neuronas en la región del hipocampo, se tiene el acoplamiento eléctrico, aunque otros factores pudieran contribuir también, como son las conexiones excitadoras recurrentes, la presencia de neuronas generadoras de ráfagas y la regulación iónica (Dudek, y col. 1999; Pérez Velásquez y Carlen, 2000).

Recientemente un gran número de trabajos han destacado la participación del acoplamiento eléctrico a través de uniones comunicantes en la actividad epileptiforme inducida en diferentes modelos *in vitro* (Pérez Velásquez y Carlen, 2000; Traub y col., 2001). A este respecto, se ha demostrado que el acoplamiento electrotónico participa en ciertos tipos de actividad eléctrica, como son, las oscilaciones gama (30-100Hz), las oscilaciones de frecuencia alta (200Hz) y los denominados pre-potenciales rápidos "spikelets" (Buzsaki y col. 1992; Valiante y col. 1995; Draguhn y col. 1998; Traub y col. 2000). Más aún, se ha observado que la pérdida de este acoplamiento eléctrico, por la presencia de bloqueadores a las uniones comunicantes o por deficiencia de alguna de las proteínas que las conforman (ratones deficientes en alguna Cx), presenta efectos antiepilepticos en diferentes modelos *in vitro* (Pérez Velásquez y Carlen, 2000; Ross y col. 2000; Traub y col. 2001; Kohling y col. 2001; Margineanu y Klitgaard, 2001; Jahromi y col. 2002; Maier y col. 2002; Pais y col. 2003; Samoilova y col. 2003).

Trabajos *in vivo* han demostrado que la comunicación a través de las uniones comunicantes entre los diferentes tipos celulares de la neocorteza y del hipocampo de ratas anestesiadas como en libre movimiento, juega un papel primordial en la expresión, duración y propagación de la actividad epileptiforme inducida por la aplicación del bloqueador a los canales de potasio dependientes de voltaje  $K_A$ ,  $K_V$  y  $K_{ACh}$ , 4-aminopiridina (4-AP) (Szente y col. 2002; Gajda y col. 2003; Medina-Ceja y col. 2008). En estos estudios, se destaca el efecto antiepiléptico del bloqueador a las uniones comunicantes Carbenoxolona (CBX) y pro-epiléptico del abridor de las mismas Trimetilamina (TMA). En la neocorteza de ratas con 4-AP se ha observado un incremento en los niveles de mRNA para Cx32, Cx43 y Cx36 en la región ipsilateral como contralateral de generación de las crisis (tabla 2) (Gajda y col. 2003). Cabe destacar que la 4-AP favorece la prolongación de los potenciales de acción de las neuronas y permite la liberación inespecífica de neurotransmisores, aunque en algunas regiones parece ser que se presenta una mayor liberación del neurotransmisor excitador glu, así como una propagación de la actividad epileptiforme generada por el mismo (Morales-Villagrán y Tapia, 1996, Medina-Ceja y col. 2000, Tapia y col. 1999). En estudios realizados con tejido cerebral de pacientes con Epilepsia del Lóbulo Temporal, se ha demostrado un aumento en la expresión de la Cx43 en la glía y su posible participación en la progresión de este desorden neurológico (Fonseca y col. 2002).

A este respecto hay que considerar que el número, la composición y la función de las uniones comunicantes está altamente regulada de acuerdo a los requerimientos fisiológicos o a las condiciones patológicas que se presenten, como en el caso particular de las crisis epileptiformes (Evans y Martín, 2002; Jefferys, 1995; Carlen y col. 2000; Perez-Velazquez y Carlen, 2000; Li y col. 2001; Traub y col. 2001; Traub y col. 2002; Zoidl y Dermietzel, 2002). De esta manera, se cree que durante la fase de alcalinización mediada por potasio, que se presenta al inicio de los eventos relacionados con las crisis, se observa un aumento en el acoplamiento electrotónico y posteriormente una reducción del mismo, cuando se presenta la fase de acidificación, al final de las crisis (Xion y col. 2000), por lo que es posible pensar que la función de las uniones comunicantes a nivel del foco epiléptico se encuentra alterada, aún si la expresión de las conexinas no cambia significativamente (Söhl y col. 2000).

### **2.3 Abridores y Bloqueadores de las Uniones Comunicantes: Trimetilamina (TMA) y Quinina.**

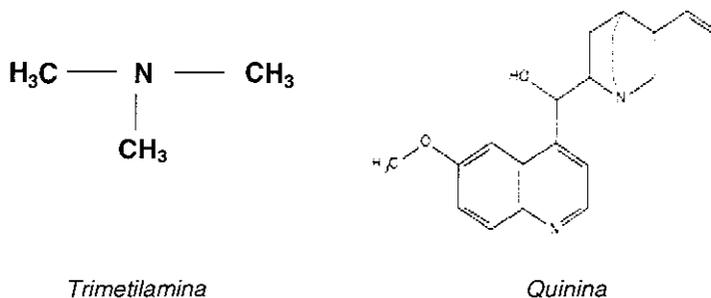
La TMA es una base débil que en su estado natural se encuentra en el tejido de animales marinos en regiones polares; genera un incremento en la concentración osmótica, para disminuir así el punto de congelamiento de los fluidos y de esta manera proteger a los animales. En otros animales no polares la TMA parece tener un efecto protector sobre factores desestabilizantes de las proteínas (Seibel y Walsh 2001). No tiene uso terapéutico, solo experimental y se le reconoce su capacidad para generar alcalinización intracelular. Este cambio de pH provoca la apertura de los canales de las uniones comunicantes y modifica la conductancia de las mismas (Lee y col. 1996, Church y Baimbridge 1991, Nedergaard y col. 1995, Spray y col. 1981). En relación al posible mecanismo de apertura de las uniones comunicantes por la TMA, se sabe que una secuencia de la región carboxilo terminal de las conexinas es determinante para sensar el cambio de pH. Asimismo, se ha dado a conocer un modelo de las interacciones intramoleculares de las conexinas en el cual la región carboxilo terminal funciona como un dominio independiente de la proteína (región a His-95) que permite el cierre del canal del conexón de una manera muy semejante a lo que ocurre en el modelo de cadena-bola para los canales de potasio. Incluso se ha observado un efecto sinérgico en relación a un aumento en la sensibilidad al pH cuando se co-expresan la Cx40 y la Cx43 (Liu y col. 1993; Morley y col. 1996; Gu y col. 2000).

**Tabla 2.** Resumen de algunos trabajos donde se ha demostrado el efecto de bloqueadores y abridores de las sinapsis eléctricas en la actividad convulsiva y los cambios en la expresión de algunas conexinas.

REFERENCIA	MODELO REGIÓN DROGA ADMINISTRADA	BLOQUEADORES/ ABRIDORES DE SINAPSIS ELÉCTRICAS	RESULTADOS ENCONTRADOS
Szente et al. 2002	<i>In vivo</i> ( <i>ratas anestesiadas</i> ) Neocorteza 4-AP	CBX	Incremento del mRNA Cx43 y Cx32 actividad epileptiforme (AE) CBX= ↓ AE
Gajda et al. 2003	<i>In vivo</i> ( <i>Ratas anestesiadas</i> ) Neocorteza 4-AP	CBX / TMA	Incremento del mRNA Cx43, Cx32 y Cx36 CBX= ↓ AE TMA= ↑ AE
Samoilova et al. 2003	<i>In vitro</i> Hipocampo Bicuculina	CBX / octanol	Incremento del mRNA Cx43 y Cx32 CBX= ↓ AE Octanol= ↓AE
Gajda et al. 2005	<i>In vivo</i> ( <i>ratas anestesiadas</i> ) Neocorteza 4-AP	Quinina	Quinina = ↓ AE
Medina-Ceja et al. 2008	<i>In vivo</i> ( <i>ratas en libre movimiento</i> ) Hipocampo/CE 4-AP	CBX	CBX= ↓ AE Conducta convulsiva ↓

Los alcoholes como el heptanol y octanol, así como el anestésico halotano bloquean la conductancia de las uniones comunicantes en una gran variedad de células y tejidos. Este efecto es debido a que se disuelven en la membrana lipídica para generar cambios en la fluidez de la membrana y de esta manera interfieren con la función del canal de las uniones comunicantes (Johnston y col. 1980; Rose y Ranson 1997; Cotrina y col. 1998).

La quinina ( $C_{20}H_{24}N_2O_2$ ) es un alcaloide natural, blanco y cristalino, se obtiene de la corteza de la quina, un árbol originario de Sudamérica con propiedades antipiréticas, antimalaria y analgésicas. Tiene un sabor amargo y es un estereoisómero de la quinidina.



**Fig. 5.** Estructura química de la Trimetilamina y Quinina.

Los efectos secundarios de la quinina que se han registrado son mareos, vómitos, cefalea, agitación, confusión, entre otros ([www.ufsm.br](http://www.ufsm.br)). La Quinina a nivel del Sistema Nervioso Central, actúa como un bloqueador específico de las uniones comunicantes conformadas por la Cx36, principal conexina en neuronas de cerebros adultos como en neonatos; su mecanismo de acción se desconoce hasta el momento. Se sabe que no cruza la barrera hematoencefálica efectivamente (Silamut y col. 1985). El efecto anti-convulsivo máximo de la Quinina oscila entre 10 y 11 minutos, pero con una dosis mayor a 80µM tiene un efecto pro-convulsivo (Gajda y col. 2005). En otro estudio realizado con penicilina como potenciador de las crisis, encontraron que la quinina bloquea la actividad epileptiforme a los 60 min posteriores a su administración y la amplitud y frecuencia de la actividad eléctrica regresaba al estado normal (Bostanci y Bagirici, 2007).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

Con base en los antecedentes descritos, el presente trabajo pretende determinar los posibles efectos pro-epilépticos y anti-epilépticos de la TMA y la quinina, abridor y bloqueador de las uniones comunicantes, respectivamente sobre la actividad epileptiforme inducida por la administración de la 4-AP en el circuito CE-hipocampo de ratas despiertas. En trabajos previos de nuestro laboratorio se ha demostrado que la carbenoxolona, inhibidor inespecífico de las uniones comunicantes bloquea la actividad epileptiforme de los animales tratados con 4-AP, así como la conducta convulsiva de los mismos; sin embargo, hasta el presente no se ha investigado el efecto de la TMA o de la quinina, este último, bloqueador específico de las uniones comunicantes compuestas de Cx36 que se encuentran exclusivamente en neuronas, en este circuito cerebral en particular y en ratas totalmente despiertas, libres de cualquier efecto anestésico, aspecto que nos permitirá valorar de igual manera las características conductuales convulsivas de los animales.

### **4. JUSTIFICACIÓN:**

En el presente estudio el grupo de trabajo del laboratorio pretende realizar un enfoque integral, que considere los aspectos conductuales convulsivos y el registro electroencefalográfico en grupos de animales epilépticos tratados con drogas que permitan la apertura y el cierre de las uniones comunicantes en el circuito de la CE-hipocampo en ratas despiertas, en libre movimiento, ya que hasta el momento, no se han encontrado estudios donde se valore de esta manera los efectos pro-convulsivantes y anticonvulsivantes de la TMA y quinina, respectivamente.

### **5. HIPÓTESIS:**

Los efectos epileptiformes, así como la conducta convulsiva inducidos por la administración de la 4-AP en ratas en libre movimiento, serán atenuados por la quinina y facilitados por la TMA.

### **6. OBJETIVOS:**

#### GENERAL

Determinar los efectos de la TMA y la quinina sobre la actividad epileptiforme inducida por la administración de la 4-AP en la corteza entorrinal de ratas en libre movimiento.

#### PARTICULARES

- Evaluar los efectos del abridor de las uniones comunicantes TMA en el desarrollo y la propagación de la actividad epileptiforme inducida por la administración de la 4-AP en la corteza entorrinal de ratas en libre movimiento.
- Determinar los efectos del bloqueador específico de las uniones comunicantes quinina en el desarrollo y la propagación de la actividad epileptiforme inducida por la administración de la 4-AP en la corteza entorrinal de ratas en libre movimiento.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS:

### 7.1. Cirugías.

Se utilizaron 35 ratas macho de la cepa Wistar (250-300g de peso), mantenidas en condiciones de bioterio y divididas en diferentes grupos experimentales de animales. Las ratas se anestesiaron con isofluorano en O<sub>2</sub> y se colocaron en un marco estereotáxico con la barra incisora posicionada a -3.3 mm. Las ratas fueron implantadas con una cánula guía (diámetro interno 0.5 mm) que a su vez funciona de electrodo de registro para la corteza entorrinal derecha (AP=-8 mm, ML= 4.6 mm y DV= 4mm) con el fin de colocar una aguja de inyección en esa región (DV= 5mm). La cánula fue barnizada en toda su extensión con la finalidad de aislarla del medio a excepción de la parte final (DV=4mm). Se colocaron cuatro electrodos de registro superficiales, uno en CA1 derecho de hipocampo (AP= -5.6 mm y ML= 5.0 mm), dos funcionaron como electrodos de referencia (por delante de bregma) y otro electrodo se utilizó como tierra (por debajo de lambda). En el grupo de quinina se colocó un quinto electrodo de registro para la región de CA1 izquierdo (AP= -5.6 mm y ML= -5.0 mm). La aguja de inyección se utilizó para administrar 4-AP, TMA y quinina en los diferentes grupos de animales (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) y TMA (Aldrich. St. Louis, MO, USA). Posteriormente se fijaron todos los electrodos y la cánula con acrílico para finalmente, permitir la recuperación de los animales durante un período de 24 horas.

### 7.2. Administración de Drogas.

Con la finalidad de evaluar la actividad epileptiforme inducida por 4-AP durante todo el tiempo de los experimentos, así como para descartar el efecto particular de la solución salina (utilizada para diluir algunas drogas), TMA y quinina sobre la actividad eléctrica de los animales, al final se dividieron en 3 **grupos controles**: a) Un grupo de 6 animales para la inyección de 4-AP (10nmoles), b) un grupo de 3 animales para la inyección de solución salina (0.9%), TMA (100nmoles) y TMA (500nmoles), cada animal recibirá tres inyecciones a diferentes tiempos (30 min, 125min y 220min de iniciado el registro EEG) de las soluciones con estos compuestos, respectivamente, con la finalidad de disminuir el número de animales utilizados, c) un grupo de 5 animales que recibió quinina (35 pmoles). Los **grupos experimentales** fueron

conformados por cuatro grupos: a) Un grupo que recibió la co-inyección de 4-AP/TMA100 (n=6), b) Un grupo que recibió la co-inyección de 4-AP/TMA500 (n=6), c) un grupo con administración de 4-AP y 30 minutos posteriores al establecimiento del patrón epileptiforme se inyectó con TMA 500nmoles (n=4), y finalmente d) un grupo con inyección de 4-AP y 30 minutos posteriores al establecimiento del patrón epileptiforme se administró Quinina 35pmoles (n=6).

Los animales recibieron las drogas antes mencionadas por un tiempo de 5 min a un flujo de 0.2  $\mu$ l/min y una vez terminado el protocolo de administración de las drogas se continuó con el registro por 90 minutos más. Las drogas fueron diluidas en solución salina, excepto la 4-AP y la quinina que son diluidas con agua HPLC. Los grupos controles recibieron la administración de las drogas bajo el mismo protocolo de registro y evaluación de la conducta.

### 7.3. Registro EEG y Conducta Convulsiva.

El registro electroencefalográfico se llevó a cabo en un polígrafo Grass de cuatro canales con una ventana de filtros de 1 Hz a 300Hz. Los datos fueron capturados en una computadora PC con el sistema de análisis y detección de señales PolyView. Los parámetros que se evaluaron fueron: Amplitud y frecuencia promedio de las descargas epileptiformes en tres periodos de 1 minuto a los tiempos de 15, 30, 45 y 90 min del registro EEG. Asimismo, se valoró la facilitación o inhibición de la propagación de la actividad epileptiforme a la región de CA1 en los grupos tratados con 4-AP y TMA, 4-AP y quinina. Finalmente, se evaluó la conducta en todos los grupos de animales, antes, durante y después de cada uno de los tratamientos, así como en los grupos control y la posible relación que pueda haber con los datos electroencefalográficos de cada uno de los grupos de animales.

Para evaluar la conducta de los animales durante la administración de los diferentes tratamientos se utilizó la escala de Racine (1972) con algunas modificaciones realizadas para el modelo de 4-AP. Los números representan las diferentes conductas obtenidas de acuerdo a la escala de Racine (1972), modificada: **0** Paro conductual (inmovilidad), piloerección, excitabilidad, hiperventilación. **1** Movimientos que provienen de labios, lengua y masticatorios; movimiento de vibrisas. **2** *clonus* de cabeza y ojos (la cabeza muestra movimientos de cabeza rápidos y de corta duración). **3** *clonus* de

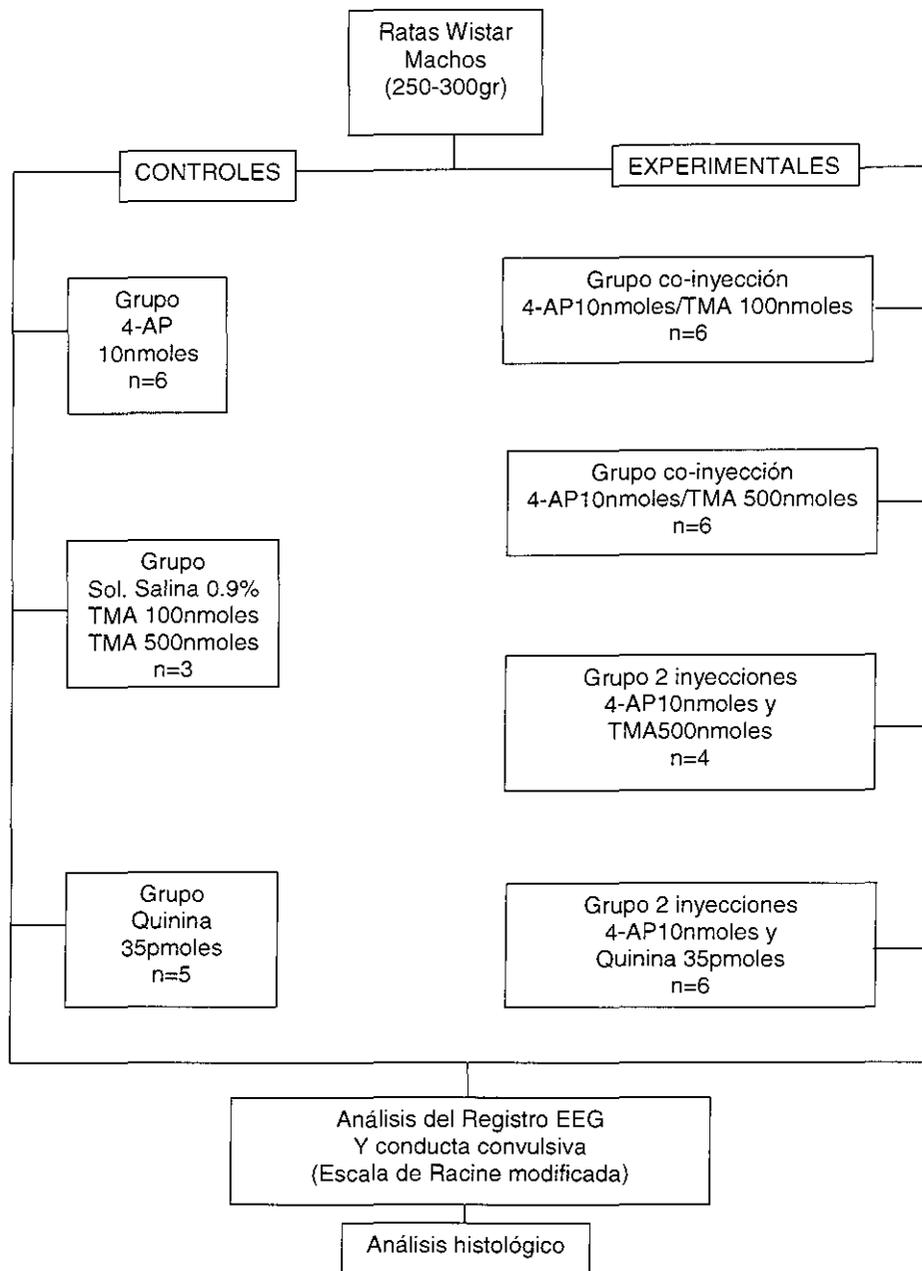
extremidades: movimientos flexores de extremidades delanteras, sacudidas de "perro mojado". **4** Convulsiones clónicas (el animal presenta sacudidas levantando sus extremidades delanteras). **5** Convulsiones clónicas con pérdida de postura, saltos descontrolados y salivación.

#### **7.4. Evaluación Histológica.**

Una vez finalizados los experimentos, las ratas fueron perfundidas con paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos (0.1M) pH 7.4. La localización correcta de la cánula guía fue confirmada con la tinción de violeta de cresilo en cortes coronales de 50  $\mu\text{m}$  obtenidos de los cerebros perfundidos de las ratas utilizadas.

El análisis comparativo de los grupos controles y experimentales fue realizado con la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba *a posteriori* de Tukey. Se considero como valor estadísticamente significativo a aquel dato con probabilidad de  $p < 0.05$ . Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  ESM. Los datos se analizaron en el paquete de software estadístico MTAB13.

## DIAGRAMA EXPERIMENTAL



## 8. RESULTADOS:

Previamente se ha descrito la actividad epileptiforme y la conducta convulsiva de animales tratados con 10 nmoles de 4-AP (Medina-Ceja y col., 2008). En ese trabajo en particular, se observó que la administración de un bloqueador de las uniones comunicantes inespecífico como la Carbenoxolona disminuye la actividad epileptiforme (amplitud y frecuencia) e incluso la bloquea totalmente, así como la conducta convulsiva. Estos datos nos permiten sugerir probablemente que en este modelo de crisis, los abridores de las uniones comunicantes como la TMA tendrán un efecto facilitador, mientras que, el bloqueador específico de las uniones comunicantes (compuestas de Cx36 localizada en neuronas particularmente) presente un efecto protector, asimismo nos permitirá determinar cual es la contribución de las uniones comunicantes neuronales en las crisis epileptiformes.

### 8.1. Efecto de la Trimetilamina sobre la actividad epileptiforme en la corteza entorrinal y la región CA1 de hipocampo.

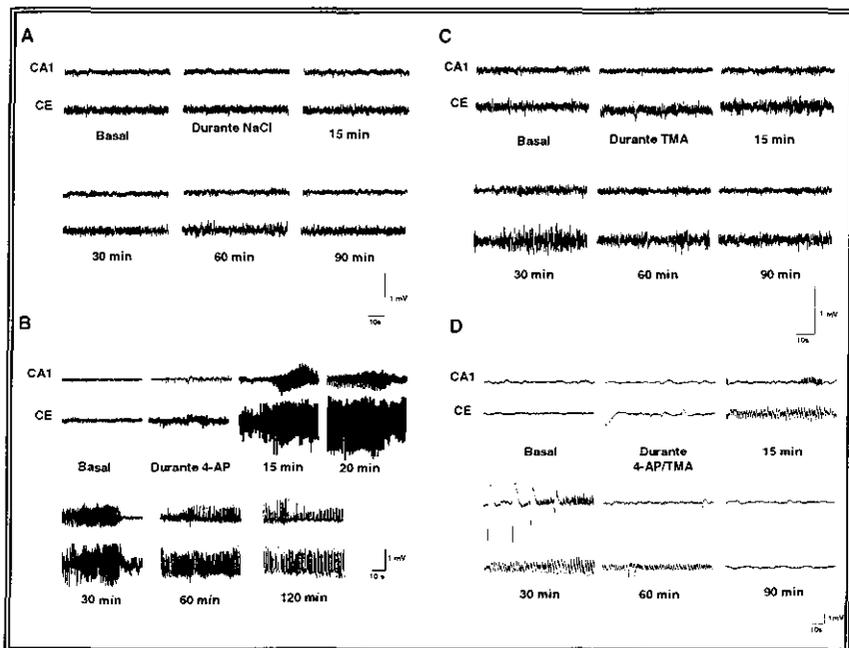
La actividad EEG basal de los grupos de animales controles y experimentales se caracterizo en general por una amplitud baja (Fig. 6 y 7). Los grupos controles que recibieron NaCl, TMA (100nmoles) y TMA (500nmoles) no presentaron cambios en la actividad EEG con respecto al registro basal hasta el final de cada experimento (Fig. 6 y 7). Se presentaron diferencias significativas en la amplitud de la actividad basal en los grupos experimentales de TMA con respecto a los grupos controles de NaCl, TMA500 y 4-AP (Amplitud en  $\mu\text{V}$ , CE/CA1: NaCl  $96.3 \pm 18.4 / 74.6 \pm 5.8$ ; TMA500  $95 \pm 18.86 / 63.6 \pm 7.87$ ; 4-AP  $178.95 \pm 12.1 / 131.12 \pm 14.79$ ; 4-AP/TMA100  $75.66 \pm 17.39$ ; 4-AP/TMA500  $208.33 \pm 19.5 / 202.83 \pm 17.9$ ; 4-AP+TMA500  $101.9 \pm 43.7$ ).

El grupo de animales que recibió sólo 4-AP presentó actividad epileptiforme que se caracterizó por una etapa inicial hiper-sincrónica seguida de trenes de polí-espigas de baja amplitud y frecuencia, así como complejos espiga-onda; la amplitud y frecuencia de los trenes de descarga epileptiforme incrementó a los pocos minutos y se propagó casi inmediatamente a la región de CA1 (latencia a la primera descarga epileptiforme CE  $21 \pm 8.02\text{s}$ , CA1  $75.7$

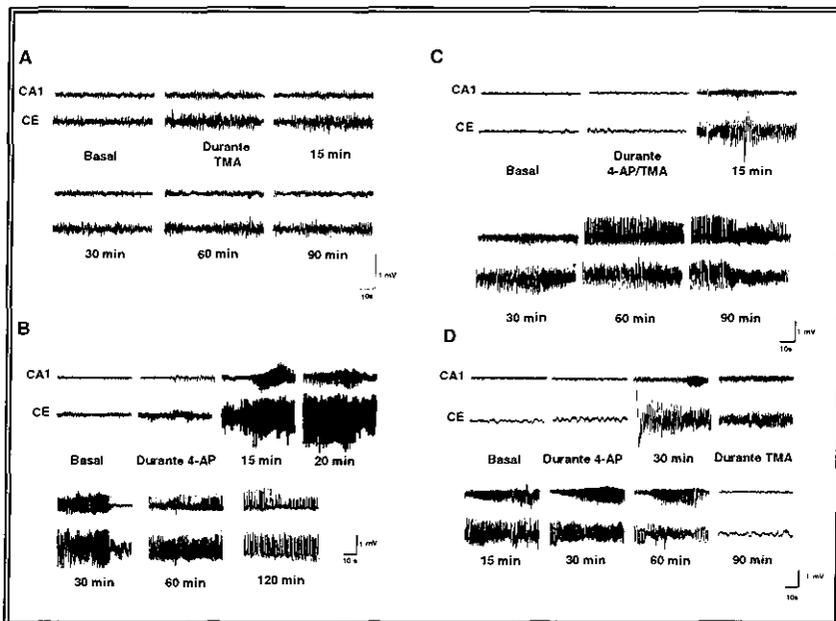
$\pm 27.3s$ ). Sólo se presentó una menor amplitud de la actividad epileptiforme posterior a la administración de 4-AP/TMA100 con respecto al grupo control que sólo recibió 4-AP (Figura 10).

Cuando se co-inyectó 4-AP y TMA (100nmoles) en la CE, se observó la presencia de descargas epileptiformes de amplitud y frecuencia alta con intervalos de actividad inter-ictal en la región de la CE durante los primeros 30 minutos, en algunas ratas esta actividad epileptiforme se propagó a la región de CA1 (Fig. 6 y 9). 90 minutos posterior a la administración de las drogas la amplitud y frecuencia de las descargas epileptiformes disminuyó hasta presentar una actividad similar a la basal tanto en la región de la CE como de CA1 de hipocampo y significativamente diferente al grupo que sólo se inyectó con 4-AP (Figura 10).

Con respecto al grupo que recibió 4-AP y TMA (500nmoles) se observaron descargas epileptiformes de amplitud y frecuencia elevada en las regiones de la CE y CA1 de hipocampo (Fig. 7 y 9). Esta actividad se presentó durante todo el experimento (120 min) y no hubo diferencias significativas con respecto a la amplitud de las descargas epileptiformes en las regiones de la CE y CA1 o en la frecuencia en la CE con respecto al grupo de animales que recibió 4-AP (Figura 10). Solo se observa una disminución significativa en la frecuencia de las descargas epileptiformes en CA1, 90 minutos posteriores a la administración de 4-AP/TMA (500nmoles) con respecto al grupo control de 4-AP (Figura 10). Asimismo, se observó una menor frecuencia de las descargas epileptiformes tanto en la CE como en la región CA1 de hipocampo en este grupo experimental 90 minutos posteriores a la administración de 4-AP/TMA (500nmoles) (Figura 9). La TMA (500nmols) co-inyectada con 4-AP (10nmols) modificó el típico patrón epileptiforme observado en el grupo inyectado sólo con 4-AP a la misma dosis y en la misma región, ya que se observó una actividad epileptiforme continua y de larga duración (*status epilepticus*) en ambas regiones estudiadas en lugar de los trenes de descargas epileptiformes del grupo con solo 4-AP (Fig. 8). En cuatro de seis ratas, esta actividad epileptiforme se presentó en la CE pero no en la región de CA1.



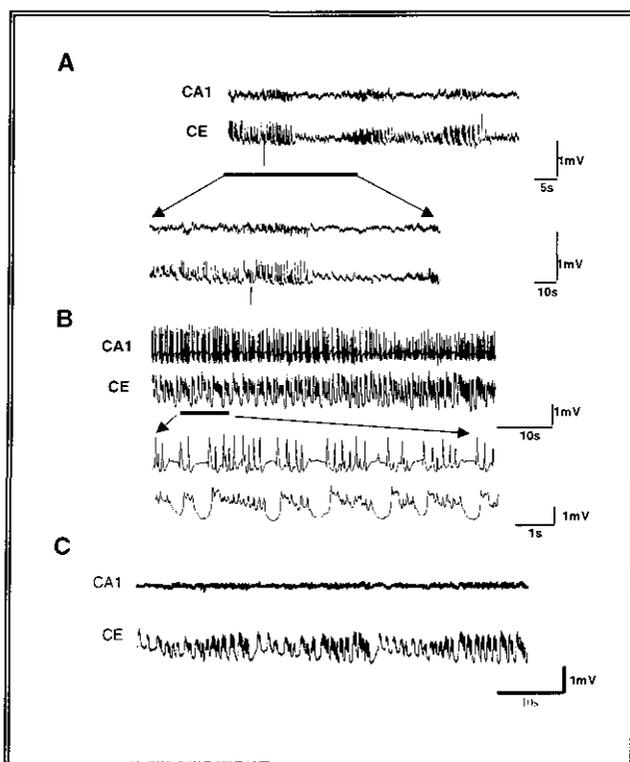
**Fig. 6.** La figura muestra los registros EEG representativos de los grupos de animales controles que recibieron A) NaCl (0.9%)  $n=3$ , B) 4-AP (10nmoles)  $n=6$  y C) TMA (100 nmoles)  $n=3$ , así como un grupo experimental con D) una co-inyección de 4-AP y TMA (100nmoles),  $n=6$ . Los registros muestran la actividad basal, durante la inyección de NaCl, 4-AP, TMA y 4-AP/TMA, así como a diferentes tiempos después de la administración de las drogas. No se observaron cambios en la actividad EEG de los grupos controles NaCl y TMA. El grupo que recibió 4-AP presentó trenes de descargas epileptiformes de amplitud y frecuencia alta que se presentaron hasta el final del experimento 120 min post administración de 4-AP. El grupo experimental que se inyectó con 4-AP/TMA presentó actividad epileptiforme de amplitud y frecuencia alta durante los primeros 30 minutos. Esta actividad epileptiforme disminuyó a los 90 minutos y presentó al final una actividad EEG similar a la basal.



**Fig. 7.** La figura muestra los registros EEG representativos de los grupos de animales controles que recibieron A) TMA (500 nmoles)  $n=3$ , B) 4-AP (10nmoles)  $n=6$ , así como dos grupos experimentales con C) una co-inyección de 4-AP y TMA (500nmoles),  $n=6$  y D) un grupo con administración de 4-AP y 30 minutos posteriores se inyecta TMA (500nmoles)  $n=4$ . Los registros muestran la actividad basal, durante la inyección de TMA, 4-AP, 4-AP/TMA, así como a diferentes tiempos después de la administración de las drogas. No se observaron cambios en la amplitud o frecuencia de la actividad EEG del grupo control con TMA. El grupo que recibió 4-AP presentó trenes de descargas epileptiformes de amplitud y frecuencia alta que se presentaron hasta el final del experimento 120 min post administración de 4-AP. El grupo con 4-AP/TMA no presenta diferencias significativas en la amplitud y frecuencia de la actividad epileptiforme con respecto al grupo que recibió solo 4-AP, solo una disminución de la frecuencia de las descargas a nivel de CA1 en el grupo tratado con 4-AP/TMA. El grupo con administración de 4-AP y 30 minutos después con TMA presentó descargas epileptiformes de amplitud y frecuencia por debajo de los valores obtenidos para el grupo tratado solo con 4-AP.

TESIS/CICBA

El grupo de animales tratados con 4-AP y 30 minutos después con TMA 500 nmoles presentó descargas epileptiformes de amplitud y frecuencia alta (Fig. 7 y 9) alternadas con actividad inter-ictal en ambas regiones estudiadas después de la administración de las drogas. Posteriormente esta actividad epileptiforme fue disminuyendo en amplitud y frecuencia en ambas regiones hasta presentar una actividad similar a la registrada durante la actividad basal (Fig. 7). Sin embargo, al comparar este grupo de animales con los grupos controles que recibieron NaCl, TMA 500 nmoles y 4-AP se observan diferencias significativas post-administración de TMA como a los 90 minutos después de aplicarla (Figura 10).



**Fig. 8.** A) Registro EEG representativo de una rata del grupo control con 4-AP, que muestra los trenes de descargas epileptiformes, las flechas indican el segmento extendido de esta actividad. B) Registro EEG representativo de una rata co-inyectada con 4-AP y TMA (500 nmoles), durante la actividad epileptiforme continua y el trazo extendido de esta actividad. C) En cuatro de seis ratas, esta actividad epileptiforme se presenta solo en la CE como se muestra en el registro.

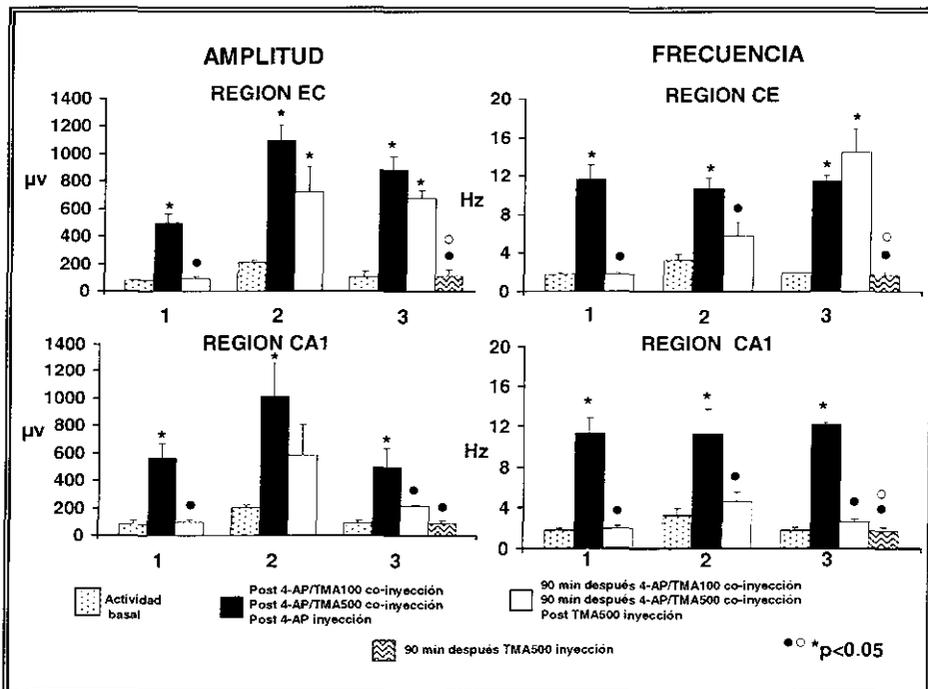
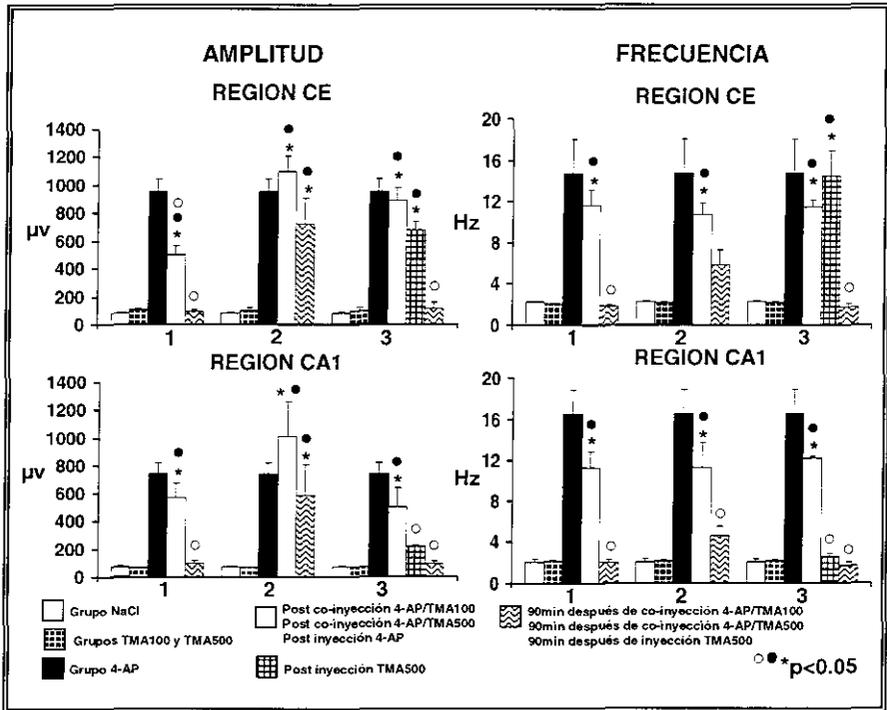


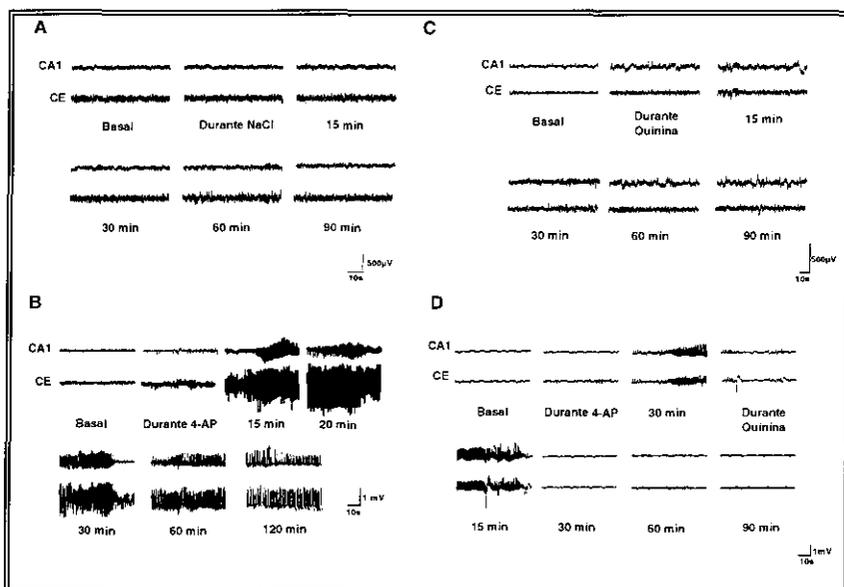
Fig. 9. Las graficas representan el promedio  $\pm$  ESM de los parámetros de amplitud y frecuencia en las regiones de la CE y CA1 de hipocampo, en tres grupos de animales: 1) 4-AP/TMA 100nmoles, 2) 4-AP/TMA 500 nmoles y 3) 4-AP y 30 minutos después TMA 500 nmoles. Los símbolos representan las siguientes comparaciones estadísticas \* Contra basal, • Contra post 4-AP/TMA100, ● Contra post 4-AP/TMA500 o ○ Contra Post TMA500.



**Fig. 10.** Las graficas representan el promedio  $\pm$  ESM de los parámetros de amplitud y frecuencia en las regiones de la CE y CA1 de hipocampo, en tres grupos de animales: 1) 4-AP/TMA 100nmoles, 2) 4-AP/TMA 500 nmoles y 3) 4-AP y 30 minutos después TMA 500 nmoles con respecto a los grupos controles de NaCl, TMA 100 nmoles, TMA500 nmoles y 4-AP 10nmoles. Los símbolos representan las siguientes comparaciones estadísticas \*contra NaCl, • contra TMA 100 o TMA 500, ○ contra 4-AP.

## **8.2. Efecto de la Quinina sobre la actividad epileptiforme en la corteza entorrinal y la región CA1 de hipocampo.**

La actividad EEG basal del grupo de animales control que recibieron quinina (35pmoles) se caracterizó en general por una amplitud baja, así como la del grupo experimental (Figura 11). No se observaron cambios significativos en la actividad EEG cuando a los animales se les administró quinina hasta el final del experimento (Figura 11). Se presentaron diferencias significativas en la actividad basal de este grupo con respecto al de 4-AP (Amplitud en  $\mu V$ , CE/CA1: 4-AP  $178.95 \pm 12.1/131.12 \pm 14.79$ ; 4-AP+quinina  $75.52 \pm 7.87/74.74 \pm 8$ ) La aplicación de 4-AP (10nmoles) en la CE de este grupo experimental produjo un patrón epileptiforme similar al del grupo control que recibió sólo 4-AP, es decir, actividad hiper-sincrónica y trenes de descargas epileptiformes de amplitud y frecuencia alta; solo se presentaron diferencias significativas en la amplitud de CA1 y frecuencia de la región de CA1 de hipocampo, siendo menores la del grupo experimental (Figura 13). Después de que se estableció el patrón de trenes de descargas epileptiformes en este grupo, la administración de quinina disminuyó la amplitud y frecuencia de las descargas epileptiformes paulatinamente hasta bloquearlas por completo a los 30 minutos posteriores a la aplicación de la quinina (Fig. 11 y 12). El efecto inhibitor de la quinina sobre la actividad epileptiforme es significativo comparado con el grupo control con 4-AP, tanto en la amplitud como en la frecuencia de las descargas de las regiones de la CE y CA1 de hipocampo tanto después de administrar la quinina como a los 90 minutos posterior a esta (Figura 13).



**Fig. 11.** Registros EEG representativos de tres grupos controles de animales que recibieron A) NaCl al 0.9%,  $n=3$ , B) con 4-AP 10 nmoles,  $n=6$  y C) Quinina 35 pmoles,  $n=5$ ; así como un grupo experimental al que se le administro D) 4-AP 10 nmoles y 30 minutos después Quinina 35 pmoles. Los trazos representan la actividad basal, durante la administración de las drogas y a diferentes tiempos posteriores a estas. En los animales con actividad epileptiforme la Quinina disminuye paulatinamente la amplitud y frecuencia de las descargas hasta bloquearlas por completo a los 30 minutos posteriores a su administración.

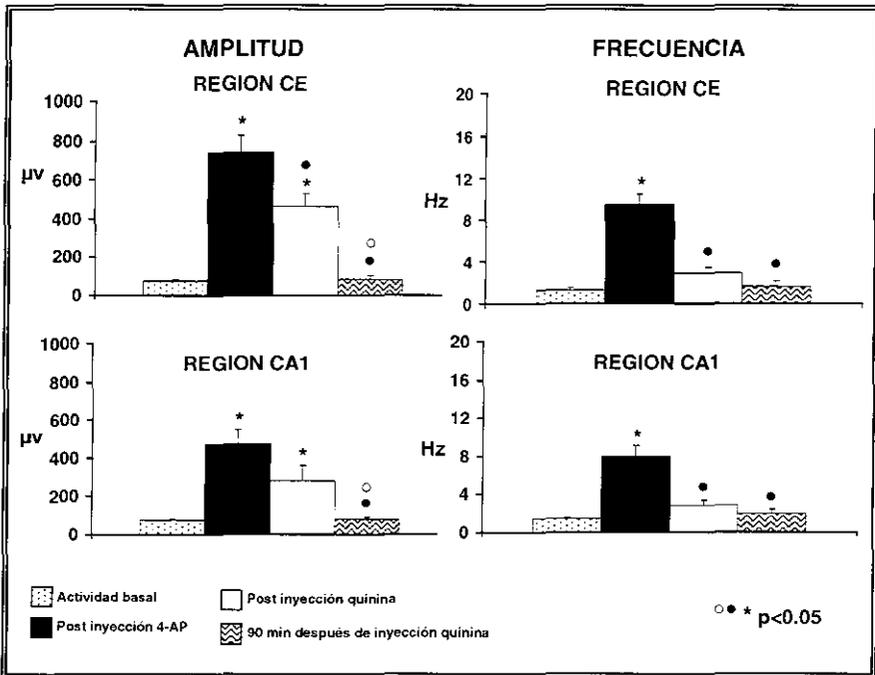
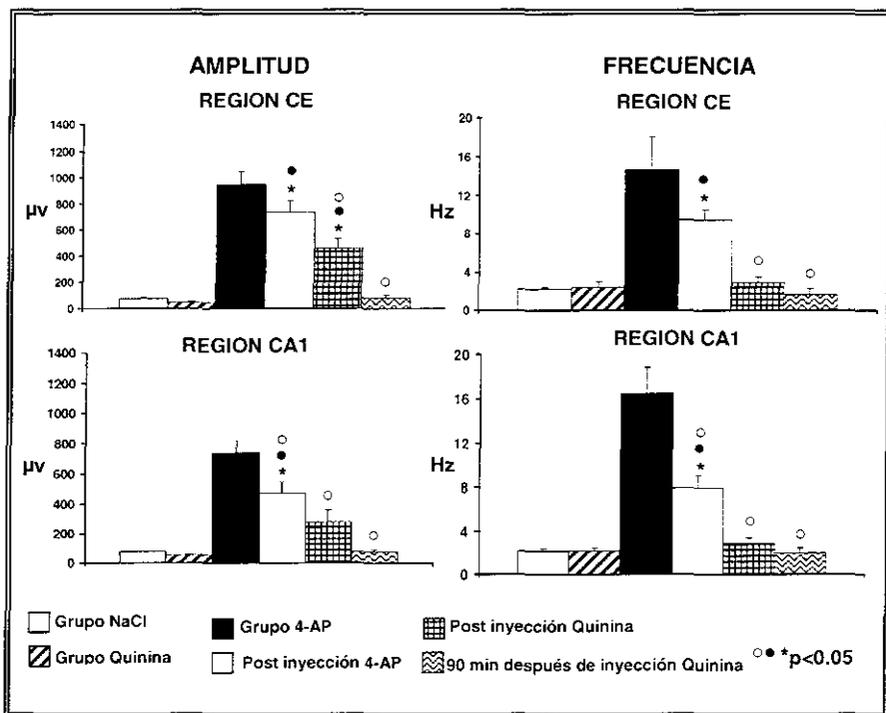


Fig. 12. Las graficas representan el promedio  $\pm$  ESM de los parámetros de amplitud y frecuencia en las regiones de la CE y CA1 de hipocampo, en el grupo de animales tratados con 4-AP 10 nmoles y 30 minutos después Quinina 35pmoles. Los símbolos representan las siguientes comparaciones estadísticas \* Contra basal, • Contra post 4-AP, ◦ Contra post inyección de quinina.



**Fig. 13.** Las graficas representan el promedio  $\pm$  ESM de los parámetros de amplitud y frecuencia en las regiones de la CE y CA1 de hipocampo, en el grupo de animales tratados con 4-AP 10 nmoles y 30 minutos después Quinina 35 pmoles con respecto a los grupos controles de NaCl, Quinina 35 pmoles y 4-AP 10nmoles. Los símbolos representan las siguientes comparaciones estadísticas \*contra NaCl, • Contra Quinina, ○ contra 4-AP.

### **8.3. Efecto de la Trimetilamina y la Quinina sobre la conducta convulsiva.**

El protocolo experimental de este trabajo nos permitió evaluar la conducta convulsiva de los animales posterior a la administración de la 4-AP y las demás drogas que abren o cierran las uniones comunicantes. Para tal propósito se utilizó la escala de Racine modificada para este modelo que se describe en la sección de materiales y métodos.

Las ratas a las que se les administró sólo 4-AP presentaron los valores en la escala de 0, 1 y 3 durante el tiempo que duró el experimento (120 minutos). Sólo dos ratas de las seis presentó el valor de 2, el resto paso de 0 a 3 en los primeros 20 minutos (Tabla 3). En las ratas que solo recibieron NaCl, TMA (100nmoles), TMA (500 nmoles) y Quinina (35 pmoles) no se observó conducta convulsiva de acuerdo a la escala de Racine utilizada y presentaron actividad de acicalamiento y rascado esporádico antes de la administración de las drogas y posterior a estas.

El grupo que recibió la co-inyección de 4-AP y TMA de 100 nmoles presentó los valores de 0, 1, 3 y 5 durante los primeros 10 minutos post administración, el valor de 5 solo se presento en tres animales. Sin embargo, después de los 30 minutos solo 3 ratas presentaron conducta convulsiva la cual fue disminuyendo paulatinamente. Al cabo de los 50 minutos después de la administración de las drogas no se presento actividad convulsiva en ninguno de los seis animales tratados.

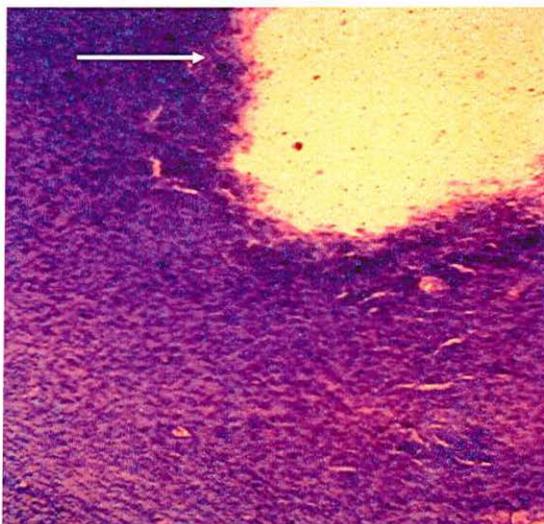
Los animales con 4-AP y TMA 500 nmoles administrados en una sola inyección presentaron los valores de 0,1 y 3 en la escala de Racine modificada durante los 70 minutos posteriores a la administración de las drogas. Una rata llego a tener el valor de 5 en los primeros 10 minutos post co-inyección. Sin embargo, a partir de los 110 minutos los valores disminuyeron en todas las ratas presentando al final del experimento valores de 0 y 1. Sólo una rata continuó con el valor de 3 hasta los 120 minutos posteriores al tratamiento.

El grupo de animales a los que se les administró 4-AP presentaron valores de 0,1 y 3 durante los primeros 30 minutos, después del tratamiento con TMA 500 nmoles, las ratas continuaron con estos valores hasta aproximadamente los 30 minutos, posteriormente la conducta convulsiva fue disminuyendo en todos los animales del grupo, de tal manera que a los 50

minutos ningún animal del grupo presentaba actividad convulsiva. Los tres grupos de animales tratados con 4-AP y TMA con diferentes dosis y protocolo de administración presentaron efectos diferenciales en la conducta convulsiva de los animales con respecto al grupo control con 4-AP (Tabla 3).

Finalmente, el grupo con actividad epileptiforme al que se le administró Quinina a una dosis muy baja de 35 pmoles, presentó una disminución paulatina en la conducta convulsiva a partir de los 30 minutos después de administrarla. Esta conducta convulsiva fue bloqueada totalmente en cinco de los seis animales del grupo al tiempo de  $53.2 \pm 10.5$  s, sólo uno de los animales permaneció con el valor de 1 en la escala de Racine modificada, sin presentar cambios hasta el final del experimento (90 minutos post Quinina). Sin embargo, en esta rata si hubo una tendencia a disminuir la conducta convulsiva (de 0, 1, 2 y 3 a 1 en los últimos 60 minutos post inyección de Quinina (Tabla 3).

La localización de las cánulas se llevo a cabo por evaluación histológica con la tinción de violeta de cresilo descrita en la sección de materiales y métodos. En la figura 14 se muestra una imagen representativa.



**Fig.14.** Fotomicrografía de una sección del corte de cerebro de rata que muestra la localización de la cánula guía (flecha) en la cual se inserta la aguja de inyección que sobrepasa la punta de la cánula por 2 mm. Tinción realizada con violeta de cresilo. Objetivo 10X.

**Tabla 3.** Conducta convulsiva de cada uno de los animales tratados en los diferentes grupos experimentales. A) Grupo 4-AP, B) 4-AP/TMA100, C) 4-AP/TMA500, D) 4-AP y 30 minutos después TMA500 y E) 4-AP y 30 minutos después Quinina. Escala de Racine modificada (1972): 0 paro conductual (inmovilidad), piloerección, excitabilidad, hiperventilación. 1 Movimientos que provienen de labios, lengua y masticatorios; movimiento de vibrisas. 2 *clonus* de cabeza y ojos (la cabeza muestra movimientos de cabeza rápidos y de corta duración). 3 *clonus* de extremidades: movimientos flexores de extremidades delanteras, sacudidas de "perro mojado". 4 Convulsiones clónicas (el animal presenta sacudidas levantando sus extremidades delanteras). 5 Convulsiones clónicas con pérdida de postura, saltos descontrolados y salivación.

<b>A Conducta convulsiva post 4-AP (10nmoles)</b>								
Rata	0-20	20-40	40-60	120	Minutos			
1	0/1/3	3	1/3	1/3				
2	0/1/3	3	2/3	1/3				
3	0/3	0/1/3	0/1/2/3	0/1/3				
4	0/1/3	0/1/3	0/1/3	0/1/3				
5	0/1/3	0/3	0/1/3	0				
6	0/1	0/1/3	0/1/3	1				

<b>B Conducta convulsiva post 4- AP (10nmoles)/TMA (100nmoles)</b>						
Rata	0-10	10-30	30-50	50-70	*	Minutos
1	0/1/3/5	0/1/3	1	-	23	
2	0/1/3	1/3	0/1/3	-	45	
3	0/1/5	0/5	1	-	40	
4	0/1/3	1	-	-	20	
5	0/1/5	5	-	-	23	
6	0/1/3	1/3	-	-	15	

<b>C Conducta post 4- AP (10nmoles)/TMA (500nmoles)</b>								
Rata	0-10	10-30	30-50	50-70	70-90	90-110	110-120	* Minutos
1	0/1	1/3	0/1/3	1/3	0/1/3	0/1	0	78
2	0/3/5	0/1/3	0/1/3	0/1/3	0/1/3	1	1	90
3	0/1/3	0/1/3	3	3	0/1/3	0/1	1	95
4	0/1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3	No
5	0/1/3	0/1/3	0/3	0/1/3	0	0	0	80
6	0/1/3	0/3/5	0/1	0/1/3	0/1/3	0/1	0	90

<b>D</b>							
Rata	Conducta Post 4-AP (10nmoles) 0-30 Minutos	Conducta Post TMA (500nmoles) 0-10 Minutos	10-30	30-50	50-70	*	Minutos
1	1/3	0	3	-	-	30	
2	0/1	0/3	1/3	3	-	35	
3	0/1/3	3	0/1/3	0/3	-	46	
4	1/3	3	1/3	-	-	26	

<b>E</b>							
Rata	Conducta Post 4-AP (10nmoles) 0-30 minutos	Conducta post Quinina (35 pmoles) 0-10 minutos	10-30	30-50	50-70	70-90	* Minutos
1	0/1/2/3	3	0/1/3	1/3	1/3	-	83
2	1/3	0/1	0/1/3	1	-	-	60
3	0/1/3	0/1/3	0/1/2/3	1	1	1	No
4	0/1/2/3	0/1/3	0/1	-	-	-	36
5	0/1/2/3	0/3	0/3	0/3	-	-	57
6	0/1/3	0/3	0/3	-	-	-	30

## 9. DISCUSIÓN:

En el presente trabajo la 4-AP (10nmoles) administrada a nivel de la CE produjo actividad epileptiforme que se caracterizó por una etapa inicial hiper-sincrónica y trenes de descarga de amplitud y frecuencia elevada; esta actividad se propagó a la región de CA1 (latencia a la primera descarga epileptiforme CE  $21 \pm 8.02s$ , CA1  $75.7 \pm 27.3s$ ) y se correlacionó con una conducta convulsiva en la escala de Racine modificada de 0, 1 y 3 durante todo el experimento. En trabajos previos de laboratorio se ha demostrado que la 4-AP incrementa los niveles extracelulares de glutamato preferentemente, en esta región (Medina-Ceja y col. 2000) y se ha considerado como posible mecanismo de inducción de crisis de esta droga una hiper-activación de los receptores de glutamato postsinápticos (Morales-Villagrán y Tapia, 1996; Tapia y col. 1999); sin embargo, también se ha encontrado que bajas concentraciones de 4-AP generan actividad epileptiforme sin afectar los niveles de glutamato (Peña y Tapia, 1999 y 2000). Este hecho nos permite pensar en la posibilidad de otro mecanismo de inducción de crisis por 4-AP que no precisamente se relaciona con las sinapsis químicas clásicas, aunque no se puede descartar completamente la participación de otros sistemas de neurotransmisión no relacionados con glutamato. Por otro lado, las variaciones encontradas en la actividad basal de los diferentes grupos de animales probablemente se deban a la variabilidad entre los individuos, ya que los experimentos se llevaron a cabo en diferentes tiempos de acuerdo a la disponibilidad de los animales en el bioterio.

Recientemente un gran número de trabajos han destacado la participación del acoplamiento eléctrico a través de las uniones comunicantes en la actividad epileptiforme inducida en diferentes modelos *in vitro* (Pérez Velásquez y Carlen, 2000; Traub y col., 2001), ya que la pérdida de este acoplamiento eléctrico, por la presencia de bloqueadores de las uniones comunicantes o por deficiencia de alguna de las proteínas que las conforman (ratones deficientes en alguna Cx), presenta efectos antiepilépticos (Pérez Velásquez y Carlen, 2000; Ross y col. 2000; Traub y col. 2001; Kohling y col. 2001; Margineanu y Klitgaard, 2001; Maier y col. 2002; Pais y col. 2003; Samoilova y col. 2003). Asimismo, algunos trabajos *in vivo* han destacado el efecto antiepiléptico y pro-epiléptico de los bloqueadores a las uniones

comunicantes Carbenoxolona (CBX) y quinina, así como del abridor de las mismas TMA, respectivamente en la neocorteza de animales anestesiados (Gajda y col. 2003, 2006). De igual manera, estudios realizados en el laboratorio, con el modelo de 4-AP (Medina-Ceja y col. 2008), nos han permitido considerar como un mecanismo probable alternativo para la inducción de crisis epileptiformes la contribución de las uniones comunicantes. En ese trabajo en particular la administración de carbenoxolona, un bloqueador inespecífico de las uniones comunicantes, disminuyó la amplitud y frecuencia de los trenes de descarga epileptiforme hasta bloquearlos por completo, así como la conducta convulsiva de los animales. Este hecho también nos permite pensar en la posibilidad de que los abridores de las uniones comunicantes como la TMA faciliten esta actividad epileptiforme como la conducta convulsiva de los animales.

Con la finalidad de determinar cual era el efecto de diferentes dosis de TMA sobre la actividad epileptiforme inducida por 4-AP, así como si este efecto se veía incrementado con la administración conjunta de 4-AP y TMA, se realizaron varios grupos experimentales. Los tres grupos realizados muestran en general, después de la 4-AP, descargas epileptiformes de amplitud y frecuencia elevada, sin embargo, el grupo que recibió 4-AP y TMA a una dosis de 100 nmoles presenta una disminución en la amplitud y frecuencia de los trenes de descarga epileptiforme a los primeros 30 minutos para posteriormente presentar una actividad muy similar a la basal. Asimismo, este grupo presentó conducta convulsiva relacionada con los valores de 0, 1, 3 y 5 durante los primeros 10 minutos, después fue descendiendo la escala hasta llegar al punto de no presentar actividad convulsiva al final de los experimentos. En cambio, los animales a los que se les administro 4-AP y TMA 500 nmoles en una sola inyección presentaron actividad epileptiforme de amplitud y frecuencia alta, la cual permaneció durante todo el tiempo del experimento (120 minutos) en ambas regiones estudiadas; cabe destacar que en cuatro de seis ratas, esta actividad epileptiforme se presentó en la CE pero no en la región de CA1; con respecto a la conducta convulsiva, los animales presentaron valores de 0,1 y 3 en la escala de Racine modificada que se observaron por mas tiempo, aunque a los 110 minutos estos valores disminuyeron en todas las ratas presentando al final la escala de 0 y 1. Finalmente, al grupo que se le

inyectó TMA 500 nmoles después de 30 minutos de haberse establecido las crisis epileptiformes, permaneció con esta actividad durante los primeros 60 minutos post-TMA para posteriormente disminuir la amplitud y frecuencia de las descargas; los valores obtenidos para este grupo en la escala de Racine modificada fueron de 0,1 y 3 sin cambio durante los primeros 30 minutos para posteriormente disminuir hasta una conducta no convulsiva.

Los resultados de este primer estudio nos permiten sugerir que la TMA abridor de las uniones comunicantes, presenta efectos diferenciales sobre la actividad epileptiforme inducida por 4-AP (10nmoles) en la CE y la región de CA1 de hipocampo, así como en la conducta convulsiva de los animales, que dependen no solo de la dosis administrada de TMA (100 nmoles o 500 nmoles) sino también del protocolo de administración de la misma (de manera conjunta o después de la 4-AP). Asimismo, de estos tres grupos experimentales, sólo el de 4AP y TMA 500nmoles en una sola administración, presentó cambios en el patrón clásico de las descargas epileptiforme con respecto a los otros dos grupos o al grupo de 4-AP, ya que se observó una actividad epileptiforme continua y de larga duración (*status epilepticus*) en ambas regiones estudiadas en lugar de los trenes de descargas epileptiformes. Estos datos en general son diferentes a los obtenidos por Gajda y colaboradores (2003, 2006) donde se muestra que la TMA aumenta la duración y la amplitud de las crisis epileptiformes inducidas por 4-AP en la región de la neocorteza de ratas, asimismo se ve facilitada la propagación de las crisis. Cabe mencionar que en estos trabajos la administración de la 4-AP se realizó a través de filtros colocados sobre la corteza durante todo el experimento y no se reguló su aplicación, además de que los animales permanecieron anestesiados durante todo el experimento. Sin embargo, en nuestro estudio la administración conjunta de 4-AP y TMA 500 nmoles si modificó el patrón de trenes de descarga epileptiforme clásico obtenido previamente con 4-AP, ya que esta actividad en el grupo experimental fue constante a lo largo del experimento "status epilepticus" sin presentar periodos inter-ictales, lo que concuerda parcialmente con los resultados observados por el grupo de Zsente en cuanto a un aumento en la duración de las crisis (2003, 2006). De igual manera, en nuestro trabajo los animales permanecieron todo el tiempo del experimento en libre movimiento y la dosis administrada de TMA a la región de la CE fue

regulada, ya que se inyectó en total 500 nmoles de TMA (flujo 0.2  $\mu\text{l}/\text{min}$  por 5 min), por lo que consideramos que el efecto de la TMA sobre la actividad epileptiforme al menos en este modelo, debe considerarse reservado, ya que depende de la dosis y el protocolo de administración. Hay que considerar que en otros trabajos la TMA permanece todo el tiempo del experimento en la región de estudio y que este hecho pudiera favorecer el efecto pro-epiléptico de la TMA sobre la actividad epileptiforme (Gajda et al., 2003, 2006), a diferencia de nuestro trabajo donde la TMA solo permanece durante el tiempo de inyección de la misma. En este trabajo en particular nuestros resultados no apoyan la hipótesis de que la TMA presente efectos facilitadores sobre la actividad epileptiforme como en otros modelos experimentales, mas aun los resultados de este estudio muestran en algunos casos la perdida de esta actividad, por lo que no descartamos la posibilidad de que otros mecanismos no-sinápticos como los efectos de campo eléctrico o interacciones iónicas (Dudek et al. 1998), así como otros sistemas de neurotransmisión no relacionados con el glutamato pudieran participar en la inducción de las crisis convulsivas por 4-AP (Peña y Tapia, 2000).

Por otra parte, la administración de quinina, bloqueador específico de la Cx36 de las uniones comunicantes, en ratas con crisis epileptiformes disminuye la amplitud y frecuencia de los trenes de descarga hasta bloquearlos por completo en ambas regiones estudiadas. Estos resultados concuerdan con los encontrados en otros estudios (Gajda y col. 2005; Bostanci y Bagirici, 2007), en donde la aplicación de quinina disminuye la actividad convulsiva inducida por 4-AP o penicilina de los animales. Sin embargo, en el primer trabajo la dosis administrada de quinina no es regulada adecuadamente, ya que se aplica una solución de 35  $\mu\text{M}$  en un filtro a nivel de la neocorteza del cerebro de los animales y por otro lado el efecto de la quinina sobre la actividad epileptiforme inducida por penicilina es dosis-dependiente, ya que los efectos anti-convulsivos de la misma incrementan de acuerdo a las dosis utilizadas de 200, 400 o 1000 nmol en las regiones de la corteza frontal y parietal. En el presente trabajo, hemos observado que incluso dosis más pequeñas de quinina (35 pmoles) tienen un efecto anti-convulsivo no sólo disminuyendo la amplitud y frecuencia de las descargas epileptiformes sino también bloqueándolas por completo tanto en la zona de inducción de las crisis (CE) como en la de

propagación (CA1). Más aun la dosis utilizada en nuestro estudio bloqueó la conducta convulsiva de los animales y sólo una de las seis ratas permaneció con el valor en la escala de 1. Este efecto nos permite sugerir la posible participación de las uniones comunicantes neuronales en las crisis epileptiformes en este modelo, ya que la quinina solo afecta la Cx36 que se expresa fundamentalmente en neuronas.

Además cabe destacar que en el presente estudio *in vivo* se trabajó con dos regiones de gran relevancia para el fenómeno epiléptico por su alta propensión a presentar esta actividad, como son la CE y CA1 de hipocampo (Steriade, 2003), así como con animales en libre movimiento; trabajos previos sólo han valorado estas regiones *in vitro* (Pérez Velásquez y Carlen, 2000; Ross y col. 2000; Traub y col. 2001; Kohling y col. 2001; Margineanu y Klitgaard, 2001; Maier y col. 2002; Pais y col. 2003; Samoilova y col. 2003) y los pocos trabajos realizados *in vivo* utilizan animales anestesiados o abordan el estudio en otras regiones como la corteza (Szente y col. 2002; Gajda y col. 2003, 2005; Bostanci y Bagirici, 2007).

El hecho de que bajas concentraciones de 4-AP produzcan actividad epileptiforme sin afectar los niveles de glutamato (Peña y Tapia, 1999, 2000) y que la aplicación de bloqueadores inespecíficos como específicos de las uniones comunicantes presenten efectos anti-convulsivos en este modelo (Medina-Ceja y col., 2008), nos permite pensar en la posibilidad de otro mecanismo alternativo de inducción de crisis por 4-AP. Existe evidencia experimental donde se ha descrito la presencia de uniones comunicantes a nivel de las células granulares del giro dentado, así como acoplamiento electrotónico entre las células piramidales de CA1 como entre las interneuronas del hipocampo (Dudek y col. 1986, 1998, 1999; Hamzei-Sichani y col. 2007), asimismo se conoce que a través de estas uniones comunicantes se favorece la sincronización de la actividad eléctrica entre los diferentes tipos celulares de la CE y CA1 (Dudek y col. 1998; Traub y col. 2002). Con base en lo anterior, podemos sugerir la posibilidad de que las uniones comunicantes jueguen un papel relevante en la hiper-sincronización de las descargas epileptiformes inducidas por 4-AP a través del acoplamiento electrotónico entre las células principales del circuito CE-hipocampo, aunque no podemos descartar del todo la posibilidad de la co-participación de las sinapsis glutamatérgicas y las

uniones comunicantes en este modelo, ya que las primeras pudieran ser relevantes para el inicio de la actividad epileptiforme en periodos de tiempo muy corto (Morales-Villagran y col. 2008) y las segundas estar más relacionadas con el manteniendo de las mismas, además de considerar la participación de otros sistemas de neurotransmisión. Es conveniente también considerar la evidencia experimental reciente donde se ha demostrado que la liberación de glutamato no solo se realiza a través de sinapsis químicas o el transporte reverso, sino que puede presentarse a través de hemicanales o conexones que están conformados por la unión de seis conexinas y que son funcionales al menos en los astrocitos del sistema nervioso (Ye y col. 2003; Takeuchi y col. 2006; Morita y col. 2007). Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten considerar la posibilidad de nuevas estrategias de tratamiento contra las crisis convulsivas, al menos en ciertos modelos de epilepsia experimental.

## 10. CONCLUSIONES:

La 4-AP administrada en la CE produce actividad epileptiforme caracterizada por trenes de descargas de amplitud y frecuencia elevada que se propagan a la región de CA1 y que se pueden correlacionar con una conducta convulsiva de 1, 2 y 3 en la escala de Racine modificada. El abridor de las uniones comunicantes TMA presenta efectos diferenciales sobre esta actividad epileptiforme y la conducta convulsiva de los animales que dependen de la dosis (100/500nmoles), el protocolo de administración de la TMA (Co-inyectada con 4-AP o aplicada 30 minutos posteriores a la administración de 4-AP) y el tiempo de permanencia de la TMA en la región estudiada. Estos resultados no apoyan la hipótesis de que la TMA sea un agente facilitador de las crisis en este modelo en particular. Por su parte, el bloqueador específico de las uniones comunicantes neuronales quinina, presenta un efecto protector contra las crisis epileptiformes y la conducta convulsiva, que se ve reflejado en una disminución de la amplitud y frecuencia de los trenes de descarga epileptiformes hasta bloquearlos por completo, así como una reducción en los valores de la escala de Racine hasta no presentar conducta convulsiva los animales, solo una de las seis ratas utilizadas en este grupo permaneció con el valor de 1. Por su parte, los animales de los grupos controles a los que se les administro NaCl (0.9%), TMA (100 y 500nmoles) y quinina (35pmoles) no presentan cambios en la actividad EEG y no manifiestan ningún tipo de conducta convulsiva. Con base en estos hechos es factible considerar la posibilidad de nuevas estrategias de tratamiento contra las crisis convulsivas, como sucede en algunos modelos de epilepsia experimental y de igual forma no descartar la posibilidad de otros mecanismos no-sinápticos o sistemas de neurotransmisión no relacionados con el glutamato que pudieran participar en la inducción de las crisis convulsivas por 4-AP.

## 11. BIBLIOGRAFÍA:

1. Afifi-Adel K., Bergman R.A. (2005). Sistema Límbico. Neuroanatomía Funcional. 2da Edición. Mc Graw Hill. México. Pp 280-295.
2. Agoston D., Hargittai P., Nagy A. (1983). Effects of 4-aminopyridine on calcium movements and changes of membrane potential in pinched-off nerve terminals from rat cerebral cortex. *Journal of Neurochemistry* 41: 745-751.
3. Bartolomei F., Khalil M., Wendling F., Sonthheimer A., Regis J., Ranjeva JP, Guye M, Chauvel P. (2005) Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study. *Epilepsia*.46(5):677-87.
4. Ben-Ari Y. (1985). Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14: 375-403.
5. Berkovics S., Scheffer J. (2001) Genetics of the epilepsies. *Epilepsia* 42 suppl. 5: 16-23.
6. Bostanci M. Ö., Bagirci F. (2007). Anticonvulsive effects of quinine on penicillin-induced epileptiform activity: An *in vivo* study. *Elsevier* 16: 166–172.
7. Bouchard R., Fedida D. (1995). Closed-and open-state binding of 4-aminopyridine to the cloned human potassium channel Kv 1.5. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 275: 864-876.
8. Buzsáki G., Horváth Z., Urioste R., Hetke J., Wise K. (1992). High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science* 256: 1025-1027.
9. Carlen P. L., Skinner F., Zhang L., Naus C., Kushnir M., Perez Velazquez J. L. (2000). The role of gap junctions in seizures. *Brain Research Reviews* 32: 235-241.
10. Church J., Baimbridge K. G. (1991). Exposure to high pH medium increases the incidence and extent of dye-coupling between rat hippocampal CA1 pyramidal cells *in vitro*. *Journal of Neuroscience* 11: 3289-3295.
11. Connors B., Long M. (2004). Electrical synapses in the mammalian brain. *Annual Reviews in Neuroscience* 27: 393-418.
12. Cotrina M. L., Lin J. H., Alves-Rodrigues A., Liu S., Li J., Azmi-Ghadimi H., Kang J., Naus C.C., Nedergaard M. (1998). Connexin regulate signaling by controlling ATP release. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 95: 15735-15740.
13. Danglot L., Triller A., Marty S. (2006). The development of hippocampal interneurons in rodents. *Hippocampus* 16:1032-1060.
14. Demb J.B., Pugh E.N. (2002). Connexin 36 forms synapses essential for night vision. *Neuron* 36: 551-553.
15. Draguhn A., Traub R. D., Schmitz D., Jefferys J. G. R. (1998). Spontaneous high frequency oscillations in electrically coupled neuronal networks in the hippocampus *in vitro*. *Nature* 394: 189-192.
16. Dudek F. E., Andrew R. D., MacVicar B. A., Snow R. W., Taylor C. P. (1983). Recent evidence for and possible significance of gap junctions and electrotonic synapses in the mammalian brain. En: H.H. Jasper, N. M. van Gelder, eds. *Basic Mechanisms of neuronal hyperexcitability*. V. Chan Palay, S. L. Palay eds. Series *Neurology and Neurobiology*. Alan R. Liss, New York, 1983, pp 31-73.
17. Dudek F. E., Patrylo P. R., Wuari J.-P. (1999). Mechanisms of neuronal synchronization during epileptiform activity. *Advances in Neurology* 79: 699-708.
18. Dudek F. E., Snow R. W., Taylor C. P. (1986). Role of electrical interactions in synchronization of epileptiform bursts. *Advances in Neurology* 44: 593-617.
19. Dudek F. E., Yasumura T., Rash J. E. (1998). Nonsynaptic mechanisms in seizures and epileptogenesis. *Cellular Biology International* 22: 793-805.
20. Engel J. (1995). Concepts of epilepsy. *Epilepsia*, 36 (Suppl. 1):S23-S29.
21. Evans W. H., Martin P. E. (2002). Gap junctions: structure and function (review). *Molecular of Membrane Biology* 19: 121-136.
22. Falk M. M. (2000). Connexin-specific distribution within gap junctions revealed in living cells. *Journal of Cell Science* 113: 4109-4120.
23. Fonseca C. G., Green C. R., Nicholson N. F. B. (2002). Upregulation in astrocytic connexin 43 gap junction levels may exacerbate generalizad seizures in mesial temporal lobe epilepsy. *Brain Research* 929: 105-116.
24. Fountain N., Near J., Bertram H., Lothman E. (1998) Responses of deep entorhinal cortex are epileptiform in an electrogenic rat model of chronic temporal lobe epilepsy. *Journal of Neurophysiology*. 80: 230–240.

25. Fragoso-Veloz J., Massieu L., Alvarado R., Tapia R. (1990). Seizures and wet dog shakes induced by 4-aminopyridine and their potentiation by nifedipine. *European Journal of Pharmacology* 178: 275-284.
26. Fricker D., Miles R. (2001). Interneurons, spike timing, and perception. *Neuron* 32: 771-774.
27. Gajda Z., Gyengesi E., Hermesz E., Ali K. S., Szente M. (2003). Involvement of gap junctions in the manifestations and control of the duration of seizures in rats *in vivo*. *Epilepsia* 44: 1596-1600.
28. Gajda Z., Hermesz E., Gyengési E., Szupera Z., Szente M. (2006). The functional significance of gap junction channels in the epileptogenicity and seizure susceptibility of juvenile rats. *Epilepsia* 47(6): 1009-1022.
29. Gajda Z., Szupera Z., Blazsó G., Szente M. (2005). Quinine, a blocker of neuronal Cx36 Channels, suppresses seizure activity in rat neocortex *in vivo*. *Epilepsia* 46 (10): 1581-1591.
30. Gajda Z., Gyengés E., Hermesz E., Ali S., Szente M. (2003). Involvement of gap junctions in the manifestation and control of the duration of seizures in rats *in vivo*. *Epilepsia*. Vol., 44-12 pags. 1596-1600.
31. Galarreta M., Hestrin S. (2001). Electrical synapses between GABA releasing interneurons. *Nature Reviews in Neuroscience* 2: 425-433.
32. Gandolfo G., Gottesmann C., Bidard J. N., Lazdunski M. (1989). Ca<sup>++</sup> channel blockers prevent seizures induced by class of K<sup>+</sup> channel inhibitors. *European Journal of Pharmacology* 160: 173-177.
33. Gibson G. E., Manger T. (1988). Changes in cytosolic free calcium with 1,2,3,4-tetrahydro-5-aminoacridine, 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine. *Biochemistry and Pharmacology* 37: 4191-4196.
34. Gillespie J. I., Hunter O. F. (1975). The action of 4-aminopyridine on the delayed potassium current in skeletal muscle fibres. *Journal of Physiology* 252: 70-71.
35. Glover W. E. (1982). The aminopyridines. *Genetics Pharmacology* 13: 259-474.
36. Gu H., Ek-Vitorin J.F., Taffet S.M., Delmar M. (2000). Ultra rapid communication: coexpression of connexins 40 and 43 enhances the pH sensitivity of gap junctions: a model for synergistic interactions among connexins. *Circulation Research* 86: e98-e103.
37. Hamzei-Sichani F., Kamasawa N., Janssen WG, Yasumura T, Davidson KG, Hof PR, Weame SL, Stewart MG, Young SR, Whittington MA, Rash JE, Traub RD. (2007). Gap junctions on hippocampal mossy fiber axons demonstrated by thin-section electron microscopy and freeze fracture replica immunogold labeling. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America* 104:12548-53.
38. Hara Y., Kitamura K., Kuriyama H. (1980) Actions of 4-Aminopyridine on vascular smooth muscle tissues of the Guinea-pig. *British Journal of Pharmacology*, 68: 99-106.
39. Hille B. (1984). En: Ionic channels of excitable membranes. Hille B., Sunderland M. A., (Editores). Sinauer Assoc. pp. 99-116.
40. Hu P.-S., Fredholm B. B. (1991). 4-Aminopyridine-induced increase in basal and stimulation-evoked (<sup>3</sup>H)-NA release in slice from rat hippocampus: Ca<sup>2+</sup> sensitivity and presynaptic control. *British Journal of Pharmacology* 102: 764-768.
41. Jahromi S. S., Wentlandt K., Piran S., Carlen P. L. (2002) Anticonvulsant actions of gap junctional blockers in a *in vitro* seizure model. *Journal of Neurophysiology* 88: 1893-1902.
42. Jefferys J. G. (1995) Nonsynaptic modulation of neuronal activity in the brain: electric currents and extracellular ions. *Physiology Reviews* 75: 689-723.
43. Jin S., Fredholm B. B. (1994). Role of NMDA, AMPA and Kainate receptors in mediating glutamate and 4-aminopyridine induced dopamine and acetylcholine release from rat striatal slices. *Neuropharmacology* 33: 1039-1048.
44. Johnston M. F., Simon S. A., Ramon F. (1980). Interaction of anesthetics with electrical synapses. *Nature* 286: 498-500.
45. Jefferys J. G. (2003) Models and mechanisms of experimental epilepsies. *Epilepsia*. 44 Suppl 12:44-50.
46. Kirsch G. E., Drewe J. A. (1993). Gating-dependent mechanism of 4-aminopyridine block in two related potassium channels. *Journal of General Physiology* 102: 797-816.
47. Kirsch G. E., Vener D. F., Drewe J. A. Brown A. M. (1993). Modulation of 4-aminopyridine block by mutation of deep pore residues in delayed rectifier K<sup>+</sup> channels. *Biophysical Journal* 64: A226.
48. Kohling R., Gladwell S. J., Bracci E., Vreugdenhil M., Jefferys J. G. (2001). Prolonged epileptiform bursting induced by 0-Mg<sup>2+</sup> in rat hippocampal slices depends on gap junctional coupling. *Neuroscience* 105: 579-587.

49. Kenyon J.L. Gibbons W. R. (1979). 4-Aminopyridine in the early outward current of sheep cardiac purkinje fibres. *Journal of General Physiology*, 73: 139-157.
50. Kumar N. M., Gilula N. B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell* 84: 381-388.
51. Lee J., Taira T., Pihlaja P., Ransom BR., Kaila K. (1996). Effects of CO<sub>2</sub> on excitatory transmission apparently caused by changes in intracellular pH in the rat hippocampal slice. *Brain Research* 706: 210-216.
52. Li J., Naus C. C., Zhang L., Carlen P. L. (2001). Upregulation of gap junction connexin 32 with epileptiform activity in the isolated mouse hippocampus. *Neuroscience* 105: 589-598.
53. Liu S., Tafet S., Stoner L., Delmar M., Vallano M. L., Jalife J., (1993). A structural basis for the unequal sensitivity of the major cardiac and liver gap junctions to intracellular acidification: the carboxy tail length. *Biophysical Journal*. 64: 1422-1433.
54. Maier N., Gülldenagel M., Söhl G., Siegmund H., Willecke K., Draguhn A. (2002). Reduction of high-frequency network oscillations (ripples) and pathological network discharges in hippocampal slices from connexin 36-deficient mice. *Journal of Physiology* 541: 521-528.
55. Margineanu D. G., Klitgaard H. (2001). Can gap junction blockade preferentially inhibit neuronal hypersynchrony vs. excitability?. *Neuropharmacology* 41: 377-383.
56. Mattson R. (2003) Overview: Idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia* Suppl. 2; 44:2-6.
57. Medina-Ceja L., Morales-Villagrán A., Tapia R. (2000). Action of 4-aminopyridine on extracellular amino acids in hippocampus and entorhinal cortex: a dual microdialysis and electroencephalographic study in awake rats. *Brain Research Bulletin* 53: 255-262.
58. 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 Research* 1187: 74-81.
59. Mihaly A., Bencsik K., Solymon T. (1990). Naltrexone potentiates 4-aminopyridine seizures in rat. *Journal of Neural Transmission* 79: 59-67.
60. Morales-Villagrán A., López-Pérez 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. *Neuroscience Letters* 275: 133-136.
61. Morales-Villagrán A., Medina-Ceja L., López-Pérez S.J. (2008). Simultaneous glutamate and EEG activity measurements during seizures in rat hippocampal region with the use of an electrochemical biosensor. *Journal of Neuroscience Methods* 168:48-53.
62. Morales-Villagrán A., Tapia R. (1996). Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo. *Neurochemistry International* 28: 35-40.
63. Morita M, Saruta C, Kozuka N, Okubo Y, Itakura M, Takahashi M, Kudo Y. (2007). Dual regulation of astrocyte gap junction hemichannels by growth factors and a pro-inflammatory cytokine via the mitogen-activated protein kinase cascade. *Glia* 55:508-15.
64. Mugnaini E. (1986). Cell junctions of astrocytes, ependyma, and related cell in the mammalian central nervous system, with emphasis on the hypothesis of a generalized functional syncytium of supporting cell, en: Fedoroff, A. Vernadakis (editores), *Astrocytes*, vol. 1 Academic Press, New York. 329-371.
65. Musil L. S., Goodenough D. A. (1993). Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 74: 1065-1077.
66. Musil L. S., Goodenough D. A. (1995). Biochemical analysis of connexon assembly, en: Y. Kanno, K. Kataoka, Y. Shiba, Y. Shibata, T. Shimazu (editores), *Intercellular Communication Through Gap Junctions*, Progress in Cell Research, vol.:4 Elsevier Science pag.: 327-330.
67. Morley G. E., Taffet S. M., Delmar M. (1996). Intramolecular interactions mediate pH regulation of connexin 43 channels. *Biophysical Journal* 70: 1294- 1302.
68. Nedergaard M., Cooper A. J. L. y Goldman S. A. (1995). Gap junctions are required for the propagation of spreading depression. *Journal of Neurobiology* 28: 433-444.
69. Pais I., Hormuzdi S. G., Monyer H., Traub R. D., Wood I. A., Buhl E. H., Whittington M. A., LeBeau F. E. N. (2003). Sharp Wave-like activity in the hippocampus *in vitro* in mice lacking the gap junction protein connexin 36. *Journal of Neurophysiology* 89: 2046-2054.
70. Pasantes-Morales H. y Arzate M. E. (1981). Effect of taurine on seizures induced by 4-aminopyridine. *Journal of Neuroscience Research* 6: 465-474.
71. Pasantes-Morales H., Arzate M. E., Quesada O., Huxtable R. J. (1987). Higher susceptibility of taurine deficient rats to seizures induced by 4-aminopyridine. *Neuropharmacology* 26: 1721-1725.

72. Pastor A., Kremer M., Möller T. H., Kettenmann R., Dermietzel (1998). Dye coupling between spinal cord oligodendrocytes: differences in coupling efficiency between gray and white matter. *Glia* 24: 108-120.
73. Peña, F., Tapia, R., (1999). Relationship among seizures, extracellular amino acids changes and neurodegeneration induced by 4-Aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and EEG study. *Journal of Neurochemistry* 72: 2006–2014.
74. 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: 547–561.
75. Pérez-Velázquez J. L., Carlen P. L. (2000). Gap junctions, synchrony and seizures. *Trends in Neuroscience* 23: 68-74.
76. Racine R.J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. II Motor seizure. Electroencephalographic Clinical Neurophysiology 32: 281-294.
77. Rash JE, Duffy HS, Dudek FE, Bilhartz BL, Whalen LR, Yasumura T. (1997). Grid-mapped freeze-fracture analysis of gap junctions in gray and white matter of adult rat central nervous system, with evidence for a “panglial syncytium” that is not coupled to neurons. *Journal of Comparative Neurology* 388: 265-292.
78. Rash JE, Yasumura T, Dudek FE, Nagy JI. (2001). Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *Journal of Neuroscience* 21:1983-2000.
79. Rogawski M. A. y Barker J. L. (1983). Effects of 4-aminopyridine on calcium action potentials and calcium current under voltage clamp in spinal neurons. *Brain Research* 280: 180-185.
80. Rogawski M. A. (1985). The A current: how ubiquitous a feature of excitable cells is it?. *Trends in Neuroscience* 8: 214-219.
81. Rose C. R., Ransom B.R. (1997). Gap junctions equalize intracellular Na<sup>+</sup> concentration in astrocytes. *Glia* 20: 299-307.
82. Ross F. M., Gwyn P., Spanswick D., Davies S. N. (2000). Carbenoxolone depresses spontaneous epileptiform activity in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neuroscience* 100: 789-796.
83. Rouach N., Avignone E., Meme W., Koulakoff A., Venance L., Blomstrand F., Giaume, C. (2002). Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biology of the Cell* 94:457-475.
84. Rowley H. L., Marsden C. A., Martin K. F. (1995). Differential effects of phenytoin and sodium valproate on seizures induced changes in  $\gamma$ -aminobutyric acid and glutamate release *in vivo*. *European Journal of Pharmacology* 294: 541-546.
85. Russell S. N., Publicover N. G., Hart P. J., Carl A., Hume J. R., Sanders K. M., Horowitz B. (1994). Block by 4-aminopyridine of a kv 1.2 delayed rectifier K<sup>+</sup> current expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology* 481: 571-584.
86. Samoilova M. Li J. Pelletier M.R. Wentland K. Adamchik Y. Naus C. C. Carlen P. L. (2003). Epileptiform activity in hippocampal slice cultures exposed chronically to bicuculline: increased gap junctional function and expression. *Journal of Neurochemistry*, 86, 687–699.
87. Schmitz D., Schuchmann S., Fisahn A., Draguhn A., Buhí E. H., Petrasch-Parwez E., Dermietzel R., Heinemann U., Traub R. D. (2001). Axo-axonal coupling: a novel mechanism for ultrafast neuronal communication. *Neuron* 31: 831-840.
88. Seibel B., Walsh P. (2001). Trimethylamine oxide accumulation in marine animals: relationship to acylglycerol storage. *The Journal of Experimental Biology* 205: 297-306.
89. Silamut K., White N.J., Looareesuwan S., Warrell D.A. Binding of quinine to plasma proteins in falciparum malaria (1985). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34:681-6.
90. Simon A., Oláh S., Molnár G., Szabadics J., Tamás G. (2005). Gap-junctional coupling between neurogliaform cells and various interneuron types in the neocortex. *Journal of Neuroscience* 25: 6278-6285.
91. Söhl G., Güldenagel M., Beck H., Teubner B., Traub O., Gutiérrez R., Heinemann U., Willecke K. (2000). Expression of connexin genes in hippocampus of kainate-treated and kindled rats under conditions of experimental epilepsy. *Molecular Brain Research* 83: 44-51.
92. Sohl G., Maxeiner S., Willecke K. (2005). Expression and functions of neuronal gap junctions. *Natural Review in Neuroscience* 6: 191-200.

93. Spray D.C., Harris A. L. y Bennet M. V. L. (1981). Gap junctional conductance is a simple and sensitive function of intracellular pH. *Science* 211: 712-715.
94. Spray D. C., Scemes E., Rozental R. (1999). Cell-cell communication via gap junctions. En: Zigmund M. J., Bloom F. E., Roberts J. L., Landis S. C., Squire L. R. (Eds.), *Fundamental Neuroscience*. USA. Academic Press, pp. 317-343.
95. Spruston N. (2001). Axonal gap junction send ripples through the hippocampus. *Neuron* 31: 669-671.
96. Spyker D. A., Linch C., Shabanowitz J y Jinn J. (1980). Poisoning with 4-aminopyridine: report of three cases. *Clinical toxicology*, 16: 487-497.
97. Steriade M. (2003). Neuronal substrates of sleep and epilepsy. Gran Bretaña. Cambridge University Press, pp. 408-413.
98. Szente M., Gajda Z., Ali K. S., Hermes E. (2002). Involvement of electrical coupling in the in vivo ictal epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in the neocortex. *Neuroscience* 115: 1067-1078.
99. Takeuchi H, Jin S, Wang J, Zhang G, Kawanokuchi J, Kuno R, Sonobe Y, Mizuno T, Suzumura A. (2006). Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *The Journal of Biological Chemistry* 281:21362-8.
100. Tapia, R., Medina-Ceja L., Peña F. (1999). On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, *in vivo*. *Neurochemistry International* 34: 23-31.
101. Tapia R., Stiges M. (1982). Effect of 4-Aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Research*; 250: 291-299.
102. Tapia R., Stiges M., Morales E. (1985). Mechanisms of the calcium dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Brain Research* 361: 373-382.
103. Taylor C. P., Dudek F. E. (1982). Synchronous neuronal afterdischarges in rat hippocampal slices without active chemical synapses. *Science* 218: 810-812.
104. Teubner B., Odermatt B., Gldenagel M., Shl G., Degen J., Bukauskas F., Kronengold J., Verselis V. K., Jung Y. T., Kozak C. A., Schilling K., Willecke K. (2001). Functional expression of the new gap junction gene connexin 47 transcribed in mouse brain and spinal cord neurons. *Journal of Neuroscience* 21: 1117-1126.
105. Thesleff S. (1980). Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience* 5: 1413-1419.
106. Tolner E. Kloosterman F. Kalitzin S. Lopez da Silva F. Gorter J. (2005). Physiological Changes in Chronic Epileptic Rats Are Prominent in Superficial Layers of the Medial Entorhinal Area *Epilepsia*, 46(Suppl. 5):72-81.
107. Traub R. D., Bibbig A., Fisahn A., Lebeau F. E., Whittington M. A., Buhl E. H. (2000). A model of gamma frequency network oscillations induced in the rat CA3 region by carbachol in vitro. *European Journal of Neuroscience* 12: 4093-4106.
108. Traub R. D., Bibbig A., Piechotta A., Draguhn A., Schmitz D. (2001). Synaptic and nonsynaptic contributions to giant IPSPs and ectopic spikes induced by 4-aminopyridine in the hippocampus *in vitro*. *Journal of Neurophysiology* 85:1246-1256.
109. Traub R. D., Draguhn A., Whittington M. A., Baldeweg T., Bibbig A., Buhl E. H., Schmitz D. (2002). Axonal gap junctions between principal neurons: a novel source of network oscillations, and perhaps epileptogenesis. *Reviews in the Neurosciences* 13: 1-30.
110. Valiante T. A., Pérez-Velázquez J. L., Jahromi, S. S., Carlen P. L. (1995). Coupling potentials in CA1 neurons during calcium-free-induced field Bursa activity. *Journal of Neuroscience* 15: 6946-6956.
111. Venance L., Rozov A., Blatow M., Burnashev N., Feldmeyer D., Monyer H. (2000). Connexin expression in electrically coupled postnatal rat brain neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97: 10260-10265.
112. Xion Z. Q., Saggau P., Stringer J. L. (2000). Activity-dependent intracellular acidification correlates with the duration of seizure activity. *Journal of Neuroscience* 20: 1290-1296.
113. Ye Z.-C., Wyeth M. S., Baltan-Tellol S., Ransom B. R. (2003). Functional Hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *The Journal of Neuroscience* 23(9): 3588-3596.
114. Yusta Izuierdo A. (2005) Crisis convulsivas, concepto, clasificación y etiologia. *Emergencias* 17:S68-S73.

115. Zoidl G., Dermietzel R. (2002). On the search for the electrical synapse: a glimpse at the future. *Cell Tissue Research* 310: 137-142.
116. Zsiros V., Maccaferri G. (2005). Electrical Coupling between interneurons with different excitable properties in the stratum lacunosum-moleculare of the juvenile CA1 rat hippocampus. *Journal of Neuroscience* 25: 8686-8695.

TESIS/CUCBA