
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



LIBERACIÓN DE DOPAMINA Y CONTEO DE CÉLULAS TH-POSITIVAS EN LA VÍA MESOCORTICAL CEREBRAL, EN RATAS CON ASFIXIA PERINATAL TRATADAS CON CARBAMAZEPINA.

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

JORGE CASILLAS BARBA



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

C. JORGE CASILLAS BARBA
PRESENTE

Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: "**LIBERACIÓN DE DOPAMINA Y CONTEO DE CÉLULAS TH-POSITIVAS EN LA VÍA MESOCORTICAL CEREBRAL, EN RATAS CON ASFIXIA PERINATAL TRATADAS CON CARBAMAZEPINA**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como directora de dicho trabajo a: **Dra. Silvia Josefina López Pérez** y como asesor al **Dr. Alberto Morales Villagrán**

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"PIENSA Y TRABAJA"

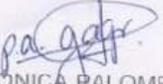
"Año del Centenario de la Escuela Preparatoria de Jalisco"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 25 de febrero de 2014


DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

COMITE DE
TITULACION




M.C. VERÓNICA PALOMERA ÁVALOS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

FORMA F

Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha.
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: "LIBERACIÓN DE DOPAMINA Y CONTEO DE CÉLULAS TH-POSITIVAS EN LA VÍA MESOCORTICAL CEREBRAL, EN RATAS CON ASFIXIA PERINATAL TRATADAS CON CARBAMAZEPINA." que realizó el pasante **Jorge Casillas Barba** con número de código **005093236** 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, Zapopan, Jal., a 21 de febrero del 2014


Dra. Silvia Josefina Lopez Perez
Directora del trabajo


Dr. Alberto Morales Villagrán
Asesor



Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Alfredo Ignacio Feria Velasco		24/02/2014
Dra. Laura Medina Ceja		21/03/2014
M.C. Rosa María Domínguez Arias Supl.		26/02/2014
Dr. Alberto Morales Villagrán		24/02/2014


27/03/14

Agradecimientos

Agradezco primeramente a mis padres Trina y Chuy por el gran apoyo que me han brindado toda mi vida en especial en esta etapa de mi vida donde descubrí mi vocación y me ayudaron a llevarla a cabo, culminando con esta tesis; así como los valores que me inculcaron para que el día de hoy llegara a ser la persona que soy y creyendo en mí inculcaron esa sensación de que yo sí puedo, para aprender día a día para seguir creciendo como persona y profesionalmente.

A mis hermanos (Rosy, Lety, Ofe, Triny, Eve y Ramón) y demás familiares que siempre me apoyaron con palabras de empuje emocional para que cumpla mis metas y no me deje derrotar ante nada.

A mis amigos que siempre estuvieron en las buenas y en las malas con palabras de aliento apoyándome y siempre haciéndome reír.

A mis maestros (la Dra. Silvia López, Vero Palomera, el Dr. Alberto Morales y cada uno que estuvo en mi proceso de formación como biólogo) que me instruyeron en mi formación académica y personal ya que aunque hayan sido bueno o hayan sido malos siempre pude sacar un aprendizaje de ellos, y sin todos sus ejemplos no hubiera logrado este paso en mi carrera.

Dedicatoria

A mis padres y hermanos que fueron y serán siempre mi empuje y motivación para lograr siempre algo nuevo; a mi amigo Lalo que antes de partir nos enseñó a luchar sin importar los obstáculos y la Dra. Silvia Josefina López Pérez y Verónica Palomera Avalos que compartieron siempre su gran conocimiento sin importar lo difícil que pudiera ser o el tiempo que requiriera.

A todos ellos y muchos más GRACIAS.

Índice

Abreviaturas	2
Resumen	4
1. Introducción	5
1.1. La neurona	6
1.2. Células gliales	6
1.3. Neurotransmisores	7
1.4. Sistema dopaminérgico	8
2. Antecedentes	12
2.1. Asfixia perinatal	12
2.2. Fisiología de la asfixia perinatal	13
2.3. Asfixia perinatal y sistema dopaminérgico	14
2.4. Modelos animales de asfixia perinatal	15
2.5. Carbamazepina	16
3. Planteamiento del problema	19
4. Justificación	20
5. Hipótesis	21
6. Objetivo general	21
6.1. Objetivos específicos	21
7. Materiales y métodos	22
7.1. Grupos experimentales	22
7.2. Cirugía estereotáxica	22
7.3. Determinación cromatográfica de dopamina y ácido 3,4-dihidroxifenilacético	23
7.4. Inmunohistoquímica	24
7.5. Conteo de células	24
7.6. Análisis de resultados	25
7.7. Diagrama experimental	27
8. Resultados	28
8.1. Localización y morfología de células del área tegmental ventral	28
8.2. Conteo de células	29
8.3. Concentración basal y liberación por 4-AP de dopamina	30
9. Discusión	35
10. Conclusiones	42
11. Perspectivas	43
12. Referencias	44

Abreviaturas

°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µm	micrómetro
4-AP	4-aminopiridina
AP	Asfixia perinatal
APs	Antero posterior
ASF	Asfixia
ATP	Adenosin Trifosfato
ATV	Área tegmental ventral
Ca ²⁺	Ion Calcio
CBZ	Carbamazepina
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
CTL	Control
DA	Dopamina
DAB	Diaminobenzidina
DE	Desviación estándar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPAC	Ácido 3,4-Dihidroxifenilacético
DP	Día posnatal
EDTA	Etilendinitrilotetracetato
EEG	Electroencefalográfico
EHI	Encefalopatía hipóxico-isquémica
Glu	Glutamato
HPLC	High Pression Liquid Cromatographyc (Cromatografía de Líquidos de Alta Presión)
HVA	Ácido homovanílico
kg	kilogramos
L	Lateral
mg	miligramo

mM	mili Molar
Na ⁺	Ion sodio
NaCl	Cloruro de sodio
nM	nano Molar
O ₂	Oxígeno
SN	Sustancia Negra
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
TH	Tirosina Hidroxilasa
V	Vertical

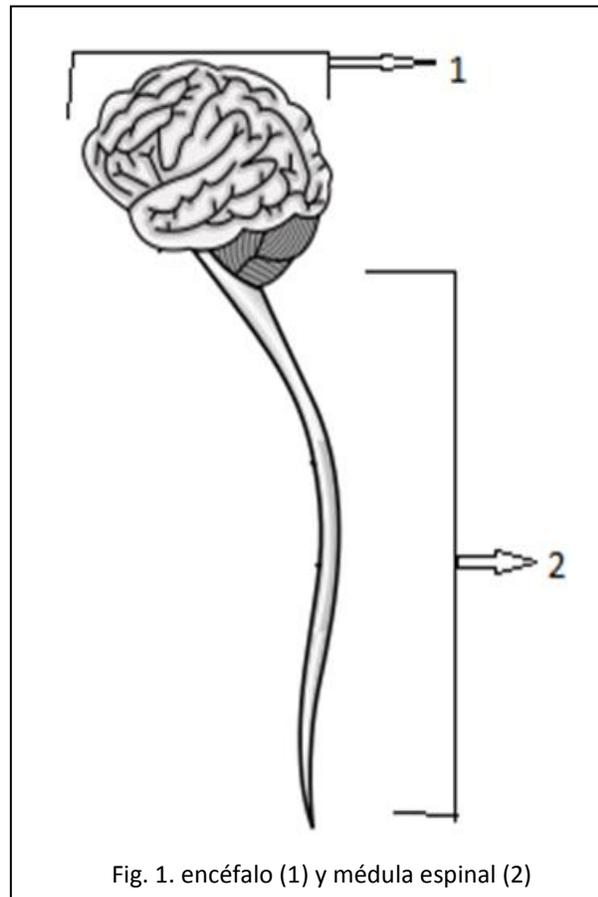
Resumen

En este trabajo se analizó el número de células positivas a tirosina hidroxilasa en el área tegmental ventral y la liberación de dopamina en la corteza frontal (núcleos principales del circuito mesocortical dopaminérgico) en animales de 30 días que fueron asfixiados en etapa perinatal y a los cuales se le suministró carbamazepina. En el caso del número de células positivas a tirosina hidroxilasa en el área tegmental ventral se encontró una disminución significativa en el grupo asfixiado con respecto al grupo control, mientras que en el grupo asfixiado más carbamazepina aumentó significativamente éste parámetro; en el caso de la liberación basal de dopamina y DOPAC ambos disminuyen en el grupo asfixiado y se recuperan en presencia de carbamazepina; en cuanto a la liberación estimulada, el grupo asfixiado no presenta el aumento esperado en ninguno de los dos neurotransmisores medidos, mientras que en el grupo asfixiado más carbamazepina si se observó un aumento ligero pero retrasado para dopamina, mientras que para DOPAC no se observó respuesta. Éstos resultados sugieren que la disminución a largo plazo de la neurotransmisión dopaminérgica asociada con la asfixia podría alterar las funciones cerebrales asociadas con el circuito mesocortical, y que la carbamazepina puede tener un efecto protector sobre los elementos de la neurotransmisión dopaminérgica que se analizaron en este trabajo.

1. INTRODUCCIÓN

La estructura del Sistema Nervioso Central (SNC) se distingue por su organización compleja y la capacidad de funcionar de forma integrada. La tarea de las neurociencias es descubrir e interpretar los patrones de organización e integración en y entre los diversos núcleos y áreas del SNC.

El SNC está formado por el encéfalo y la médula espinal (Fig.1). El encéfalo se encuentra en la cavidad craneal y está protegido por las meninges. Se divide en tres componentes principales, que son el cerebro posterior (también llamado rombencéfalo), el cerebro medio (el mesencéfalo) y el cerebro anterior (el prosencéfalo). La médula

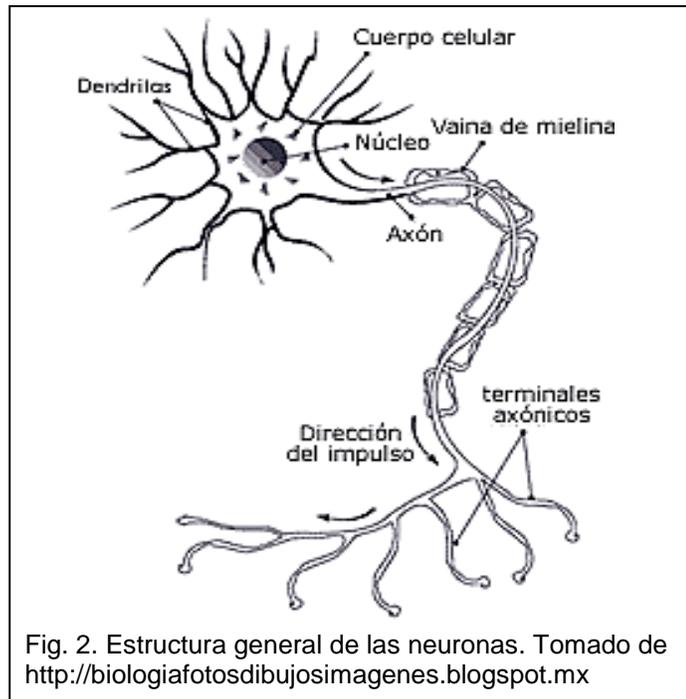


espinal está ubicada en la parte central de la columna vertebral y tiene una naturaleza segmentada, sus componentes principales son raíces motoras y raíces sensoriales que conducen información de la periferia al cerebro y viceversa (Barr, 1979). Toda la información que se genera en el SNC es transportada entre los

núcleos cerebrales por las neuronas, que son los elementos funcionales básicos del cerebro.

1.1. La neurona

Una neurona posee tres regiones estructurales (Fig. 2): el cuerpo celular, las dendritas y el axón terminal. Las dendritas son prolongaciones finamente ramificadas que se originan cerca del cuerpo celular de una neurona. Reciben impulsos excitadores o inhibidores a través de



mensajeros químicos llamados neurotransmisores, que se almacenan en vesículas citoplasmáticas. El cuerpo celular es el integrador de la información proveniente de las dendritas para elaborar una respuesta que es transmitida por el axón hacia la siguiente neurona, a través de sitios específicos llamados sinapsis (Peters y cols., 1991).

1.2. Células gliales

A diferencia de las neuronas, las células gliales no transportan mensajes eléctricos por sí mismas. Hay dos tipos de células gliales: la macroglía y la microglía. La macroglía está conformada por los siguientes tipos de células: astrocitos,

oligodendrocitos, células endoteliales, células de Müller (en SNC), células de Schwann y células satélite (en Sistema Nervioso Periférico, SNP). Los oligodendrocitos y células de Schwann funcionan como aislante eléctrico de los axones, lo que hace más eficiente y rápida la conducción de información. Los astrocitos forman la barrera hematoencefálica y son células auxiliares de las neuronas, tanto en aspectos metabólicos como de sostén (Kandel y cols., 2000). Las células endoteliales revisten los ventrículos del encéfalo y del conducto endotelial de la médula espinal que contienen al líquido cefalorraquídeo. Las células de Müller cumplen importantes funciones en la retina relacionadas con la luz; éstas actúan a modo de "filtro" de la luz que incide sobre el ojo, de modo que a la retina llega una imagen más nítida de la que entraría si la luz tuviera que atravesar las distintas capas retinales. Las células satélite, proporcionan soporte físico, protección y nutrición para las neuronas de los ganglios nerviosos, espinales y autonómicos en el SNP (Kandel y cols., 2000).

Las células microgliales se consideran como el sistema inmune del cerebro, se activan ante lesiones, daño estructural o enfermedad (Loane y Byrnes, 2010).

1.3. Neurotransmisores

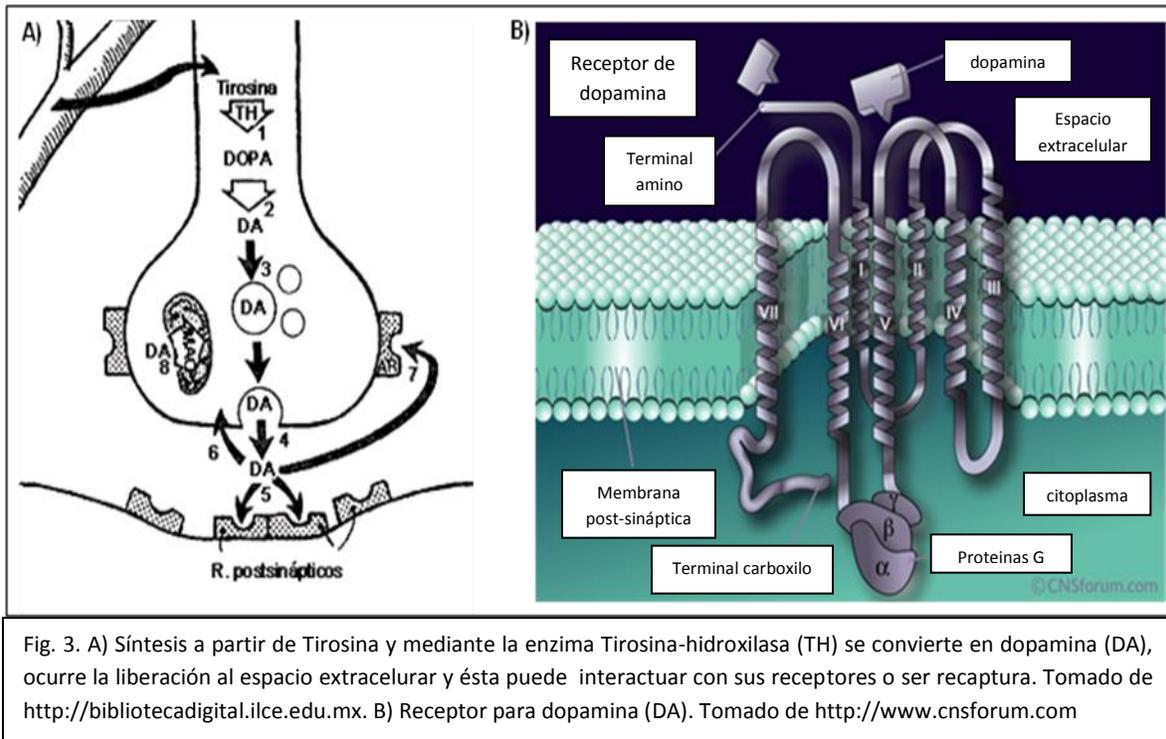
Un neurotransmisor es una sustancia química, que cuando se libera de las terminales de las neuronas en función de un potencial de acción, produce un cambio momentáneo del potencial eléctrico en la neurona post-sináptica. La función de los neurotransmisores puede ser inhibitoria o excitadora. Se sabe que algunas enfermedades neurológicas y psiquiátricas se deben a alteraciones químicas de la neurotransmisión, como por ejemplo la enfermedad de Parkinson

(Gandhi y cols., 2012), la esquizofrenia (Lodge y Grace, 2011) o la enfermedad de Huntington (Crook y Housman, 2012), que están relacionadas con alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica.

1.4. Sistema Dopaminérgico

La dopamina (DA) pertenece a la familia de las catecolaminas, que son compuestos formados por un anillo catecol y una cadena de etilamina. La síntesis del neurotransmisor tiene lugar en las terminales nerviosas dopaminérgicas, a partir del aminoácido tirosina, que se transforma en L-DOPA con la participación de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), a su vez, la L-DOPA es convertida en DA por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (Sabban, 1996). Trabajos previos han demostrado que la TH es la enzima limitante de la síntesis de la DA (Nagatsu y cols., 1964; Levitt y cols., 1965). Una vez producida la DA, la mayor parte de ella es transportada al interior de vesículas para ser liberada por exocitosis dependiente de calcio (Bahena y cols., 2000). Una vez en el espacio extracelular, la DA interactúa con sus receptores, que pueden ser post-sinápticos o autorreceptores. Los receptores para DA se clasifican en tipo D1 (subtipos D1 y D5) y tipo D2 (subtipos D2, D3 y D4) cuya estructura general consta de siete dominios transmembranales y están acoplados en el lado citoplasmático a proteínas G. La DA que no se unió a receptores es recapturada por un transportador hacia la terminal pre-sináptica donde es convertida por la enzima monoamino-oxidasa en ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), el cual es liberado al exterior de la terminal para ser convertido en ácido homovanílico (HVA) por la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT). La DA no capturada por el

transportador es directamente metabolizada en HVA en el espacio extracelular (Grima, y cols., 1985; Lamouroux y cols., 1987) (Fig. 3).



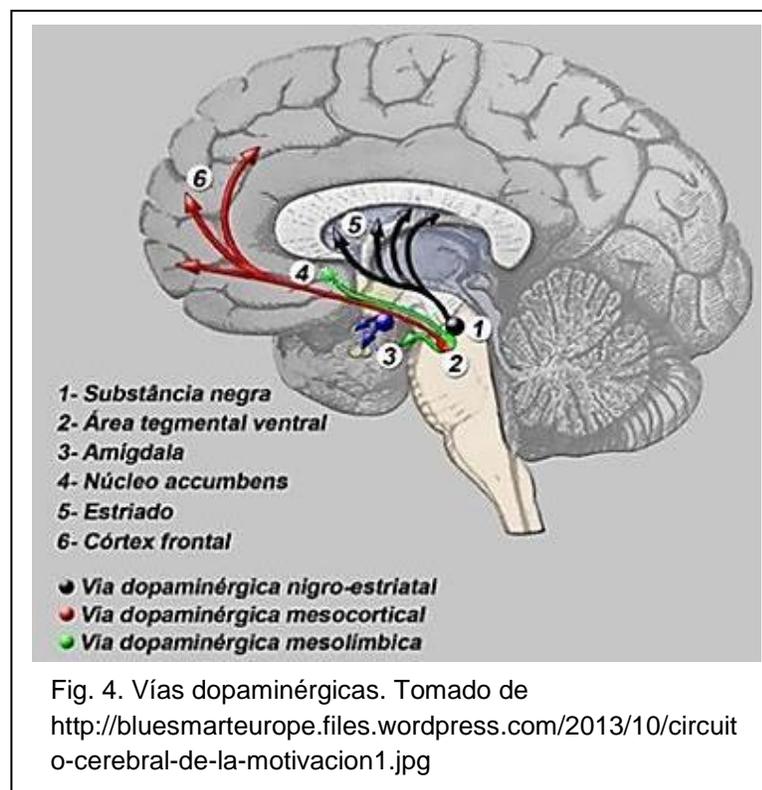
En el SNC de la rata existe un número importante de células dopaminérgicas, que se originan principalmente en áreas discretas del tallo cerebral, las cuales han sido denominadas desde A8 hasta A17 de acuerdo con la clasificación de Fuxe, elaborada en 1965 (Fuxe, 1965) y que todavía se considera vigente.

En el SNC, las vías dopaminérgicas son de longitud variable, y se pueden clasificar con base en esta característica en vías largas, cortas y ultracortas (Florez y Pazos, 2003):

a) *Vías largas:*

- *Sistema nigroestriado:* se origina en la zona compacta de la sustancia negra (A9) y en menor grado, en A8 (formación reticular mesencefálica), y proyecta al cuerpo estriado, donde forman una red densa de terminaciones (Lorenzo y cols., 2009).
- *Sistema mesolímbico:* nace en el área A10 (área tegmental ventral) y se distribuye hacia el núcleo *accumbens*, el tubérculo olfatorio, el núcleo central de la amígdala, el *septum* lateral y el núcleo intersticial de la estría terminal, que son regiones del sistema límbico(Lorenzo y cols., 2009) .
- *Sistema mesocortical:* a diferencia de lo que ocurre en los roedores, este sistema se encuentra muy desarrollado en la especie humana. Desde los núcleos A9 y A10 se proyecta hasta la corteza motora, premotora y suplementarias así como a las cortezas parietal, temporal y cingular posterior, es decir, hasta las principales áreas sensorimotoras y de asociación. Además, y al igual que en los roedores, las terminaciones dopaminérgicas se extienden a las cortezas prefrontal, cingular anterior, insular, piriforme, perirrinal, entorrinal y probablemente a la corteza visual. Dentro de la corteza, las terminaciones son más numerosas en la lámina I, en todas las láminas de las cortezas agranulares (p. ej., motora) y en las láminas I, V y VI de las granulares (p. ej., somatosensorial y asociativas) (Lorenzo y cols., 2009).

- b) *Vías cortas*: son la tuberohipofisiaria, que nace en el hipotálamo ventral tuberobasal e inerva la eminencia media y el lóbulo intermedio de la hipófisis, y la incertohipotalámica, que conecta el hipotálamo dorsal y posterior con los núcleos laterales septales. También existen pequeñas vías en el núcleo motor dorsal del vago, el núcleo del tracto solitario y la sustancia gris periacueductal (Lorenzo y cols., 2009).
- c) *Vías ultracortas*: se encuentran en la capa nuclear interna de la retina, como en células amacrinas, y las neuronas periglomerulares del bulbo olfatorio. (Lorenzo y cols., 2009) (Fig. 4).



2. ANTECEDENTES

2.1. Asfixia Perinatal

La asfixia perinatal (AP) se puede definir como la alteración producida al recién nacido por la falta de oxígeno y/o la distribución inadecuada de oxígeno en los tejidos. La consecuencia directa de la AP es la encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI), considerada la causa más frecuente de daño neurológico en los individuos afectados (Freeman, 1985; Ruiz y cols., 2001). Este es un síndrome que se asocia con alteraciones en las funciones neurológicas en los primeros días de vida, cuya severidad dependerá de la intensidad de la asfixia inicial, y se manifiesta como dificultad para iniciar y mantener la respiración, depresión del tono muscular y de los reflejos, estados anormales de la conciencia, y presencia de convulsiones (Badawi y cols., 1997).

La estimación de la incidencia de AP varía en las diferentes regiones del mundo, por ejemplo en los países desarrollados, la incidencia de la AP severa es cerca de 1 por cada 1,000 nacidos vivos y, en los países en vías de desarrollo, es un problema mucho más común, con datos que sugieren una incidencia de 5 a 10 por cada 1,000 nacidos vivos. Anualmente, la AP es responsable de aproximadamente el 23% de las cuatro millones de muertes neonatales ocurridas en el planeta (Esquiliano y cols., 2004).

En México la existencia de datos epidemiológicos que permitan conocer la dimensión del problema son escasos. En el Instituto Mexicano del Seguro Social reportaron la incidencia de EHI de 14.6 por cada 1,000 recién nacidos vivos, con una letalidad del 8.5% y un índice de secuelas de 3.6%. Una proporción

importante de sobrevivientes son pacientes que solicitan atención por algún tipo de secuela, siendo más del 90% individuos menores de 14 años (<http://www.sinais.salud.gob.mx>, 2008). Aunque en estos archivos no se especifica qué tipo de secuelas se presentan, se sabe que las más comunes son las deficiencias cognoscitivas (problemas de atención, memoria de corto y largo plazo) y las crisis epilépticas (Powell y cols., 2010), que al menos en las instituciones mexicanas se abordan con un tratamiento genérico con carbamazepina (CBZ) (Cuadro Básico de Medicamentos Neurológicos de la SSA, http://www.csg.salud.gob.mx/interiores/cb_cat/medicamentos/cbycat_med/15_neuro.pdf; Resendiz y cols., 2007).

2.2. Fisiología de la AP

En un nivel orgánico, la disminución en el aporte de O₂ a los tejidos y órganos del cuerpo genera acidosis respiratoria debida a la sobreproducción de ácido láctico, que interfiere con el ciclo de Krebs y por lo tanto con la fosforilación oxidativa que se lleva a cabo en las mitocondrias, traduciéndose en una modificación en el aporte de ATP (Ferrero y cols., 2011; Selivanov y cols., 2011). Los mediadores moleculares que inician esta respuesta sistémica no han sido descritos, aunque se han propuesto algunos candidatos que incluyen proteínas pertenecientes a la cadena respiratoria mitocondrial y varias proteínas no mitocondriales (Acker y Acker, 2004). De igual forma, la re-oxigenación, que puede ocurrir espontáneamente o a través de manipulaciones clínicas, produce cantidades importantes de especies reactivas de oxígeno que son dañinas para la célula, y especialmente para las neuronas (Li y Jackson, 2002; Lehotský y cols., 2002).

Además, trabajos previos realizados en condiciones de baja concentración de O₂ observaron despolarización de la membrana neuronal causada por la afectación de las bombas iónicas que mantienen el potencial de membrana, y que son dependientes de ATP (Yamamoto y cols., 1997; Zhang y cols., 2009). Esto facilita la liberación de neurotransmisores al espacio extracelular y puede generar una condición de excitotoxicidad (Rothman, 1984; Dubinsky y Rothman 1991), que afectará a todos los sistemas neuroquímicos en diferente medida. En apoyo de esto, un estudio previo de nuestro grupo de trabajo muestra que la concentración del neurotransmisor glutamato (Glu), principal generador de excitotoxicidad en el tejido nervioso (Morales y cols., 2013), aumenta significativamente durante la inducción de AP, y se mantiene elevada cuando menos por 120 min después de la AP (López-Pérez y cols., 2012).

2.3. AP y sistema dopaminérgico

Los resultados de trabajos previos evidencian que el fenómeno de excitotoxicidad, que aparece como resultado de la AP, afecta al sistema dopaminérgico, pues se han observado alteraciones a largo plazo en la expresión de receptores y transportador para DA, en un modelo de excitotoxicidad inducida en etapa neonatal (López-Pérez y cols., 2005); otros estudios indican que la degeneración dopaminérgica observada en la enfermedad de Parkinson está también asociada a excitotoxicidad (Miranda y cols., 1997; Counihan y cols., 1998). Sin embargo, existe información divergente con respecto a la respuesta dopaminérgica a la carencia de oxígeno en el cerebro: estudios realizados en modelos animales donde se induce hipoxia por agentes químicos (Beal y cols., 1993) o por asfixia

mediante manipulación de los fetos dentro de los cuernos uterinos (Bustamante y cols., 2007), concuerdan en reportar una disminución importante en la concentración de DA y DOPAC cuando los animales alcanzan la edad de 1 y 3 meses, respectivamente. Aunque de igual forma hay reportes de aumento en la misma variable (Ungethüm y cols., 1996; Chen y cols., 1997; Nakajima y cols., 1999). Estas diferencias señalan la necesidad de estudios detallados del sistema dopaminérgico en condiciones de AP.

2.4. Modelos animales de AP

Para abordar el estudio de las anomalías que produce la AP, se manejan tres modelos:

- a) Obtención de los cuernos uterinos mediante cesárea con las crías en el interior. Una vez fuera del cuerpo de la madre, los cuernos uterinos se sumergen en agua a 37°C un tiempo determinado, y posteriormente se procede a sacar a las crías, que son entregadas a madres sustitutas (Weitzdoerfer y cols., 2004).
- b) Ligadura de arteria carótida, y posterior inducción de asfixia en ambiente de baja concentración de O₂. Con esta manipulación se logra disminuir en primera instancia el aporte de sangre al tejido nervioso, con la consecuencia inmediata de disminuir el nivel de O₂ cerebral, lo que genera un efecto isquémico. En este modelo se observa daño preferencial de la materia blanca, por lo que se utiliza para probar el efecto de varias drogas sobre el desarrollo de la leucomalacia periventricular (Lin y cols., 2004; Kadam y Dudek, 2007).

- c) Inducción de hipoxia en cámara sellada, en donde se utiliza una mezcla de O₂ en baja concentración (3-4 %) con nitrógeno. Con este modelo se busca alterar el intercambio gaseoso a nivel pulmonar del neonato, con la subsiguiente inducción de hipoxemia, hipercapnia e hipoxia en los tejidos, incluyendo el nervioso. En este sentido, este último modelo tal vez sea el que más se acerque a las condiciones en que se produce el daño cerebral por hipoxia en el neonato incapaz de sostener una actividad pulmonar adecuada. El modelo se estableció originalmente para estudiar la relación entre la hipoxia y la generación de crisis epileptiformes (Jensen y Wang, 1996; Jensen, 2002).

2.5. Carbamazepina

La carbamazepina (CBZ) es una droga con propiedades anticonvulsivas que se utiliza rutinariamente para el tratamiento de crisis convulsivas generalizadas o parciales en niños y en adultos (cuadro básico de medicamentos para neurología, SSA, México, 2009); se puede utilizar sola o en combinación con otros medicamentos, y también se usa para tratar la neuralgia del trigémino (una afección que provoca dolor del nervio facial), episodios de manía (estado de ánimo anormalmente excitado o irritable, y frenético) o episodios mixtos (síntoma de manía y depresión que se producen al mismo tiempo) en pacientes con trastorno bipolar (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/meds/a682237-es.html>, página actualizada el 28 de agosto de 2013). En general, el tratamiento con CBZ es bien tolerado por los pacientes, aunque algunos pueden experimentar efectos secundarios como somnolencia, mareos, náuseas, dolor de cabeza,

ansiedad, problemas de memoria, diarrea y acidez estomacal (hoja de control, Laboratorio Induquímica S.A., Lima, Perú) y en personas susceptibles puede generar problemas graves como confusión, pérdida de contacto con la realidad o problemas de visión (Walker y cols.,

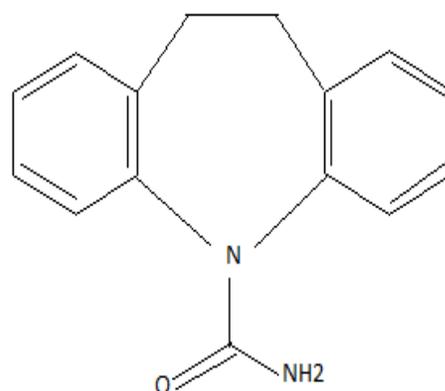


Fig. 5- Estructura química de la CBZ.

1996). En ciertos pacientes la CBZ puede producir el síndrome de Stevens-Johnson, que consiste en una grave afección de la piel descrita principalmente en personas asiáticas (Bae y cols., 2013), aunque se ha reportado también en adultos y niños de ascendencia europea (Levi y cols., 2009; McCormack y cols., 2011).

La CBZ ($C_{15}H_{12}N_2O$) es un compuesto estructuralmente similar a los antidepresivos tricíclicos (Fig. 5). Fue descubierto por el químico suizo Walter Schindler en 1953 (Schindler y Hafliger, 1954), y se utiliza como anticonvulsivante en Europa desde 1965, y en Estados Unidos y el resto del mundo desde 1974 (Grzesiak y cols., 2003). Este fármaco se metaboliza en el hígado a través del citocromo hepático P450, siendo su principal metabolito la carbamazepina-10,11-epóxido, con un tiempo aproximado de eliminación de 15 horas (Tolou-Ghamari y cols., 2013).

En cuanto a su mecanismo de acción, se cree que la CBZ bloquea los canales de Na^+ , uniéndose preferentemente al estado inactivo del canal, lo que resulta en el bloqueo de la actividad epileptiforme (Yang y Kuo, 2002; Lipkind y cols., 2011), aunque realmente no se ha logrado demostrar que la CBZ bloquea totalmente las

corrientes de Na^+ a través de estos canales, pues al parecer su efecto depende de la composición de subunidades del mismo (Uebachs y cols., 2010; Theile y Cummins, 2011). A partir de estudios electroencefalográficos (EEG) realizados en animales con crisis parciales complejas producidas con toxina tetánica, se concluyó que la CBZ podría estar interfiriendo con la diseminación de la actividad epileptiforme, y no actuando sobre las neuronas del foco epiléptico (Hawkins y cols., 1985).

Por otro lado, se ha demostrado que la CBZ administrada intraperitonealmente (ip) o por vía oral alcanza el tejido cerebral 1 hora después de haber sido administrada (Potschka y cols., 2003; Clinckers y cols., 2008), aunque no se sabe con exactitud el mecanismo que moviliza a esta droga a través de la barrera hematoencefálica, pues no se ha demostrado que se relacione de manera suficiente con algún tipo de los transportadores multidroga de la familia ABC, localizados en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, que son los que regularmente se asocian con el transporte de drogas anticonvulsivas (Lee y cols., 2001). Al parecer, la CBZ utiliza varios transportadores simultáneamente (Sun y cols., 2006), o es posible que utilice un transportador no perteneciente a la familia ABC, denominado RLIP6 (Awasthi y cols., 2005).

3. Planteamiento de problema

Uno de los problemas más comunes relacionados con el nacimiento es la AP, que en su calificación clínica de leve a moderada representa una de las condiciones patológicas de diagnóstico más común. En una proporción importante de los sobrevivientes se han descrito trastornos de conducta, de atención y de aprendizaje, así como crisis epilépticas que interfieren con el desarrollo normal de los sujetos, principalmente en la etapa infantil-juvenil, cuando los circuitos neuronales están en etapa de consolidación en relación a los primeros años de instrucción escolar. Por otro lado, es común que los individuos que presentan algún tipo de secuela de la AP vivan medicados, siendo la CBZ uno de los medicamentos indicados dentro de los servicios públicos de salud en nuestro país (IMSS, ISSSTE, SSA) para el tratamiento y/o prevención de crisis epilépticas asociadas a eventos de AP.

4. Justificación

A pesar del conocimiento adquirido en las últimas décadas sobre las patologías asociadas con la AP, permanece como una condición causante de mortalidad y morbilidad significativa, así como de discapacidades a largo plazo. Con esto es claro que la AP podría tener efectos importantes en la vida de los individuos, a través de modificaciones en los sistemas de neurotransmisión y circuitos neuronales principales, como es el sistema dopaminérgico mesocortical, del cual no se tiene información acerca del efecto de AP y la presencia de fármacos como la CBZ, para tratar sus secuelas. Los resultados de este trabajo podrían ser útiles para entender cómo se modifican las funciones cerebrales relacionadas con la vía mesocortical en pacientes con un historial de AP medicados con CBZ por periodos prolongados de tiempo.

5. Hipótesis:

La AP disminuye las células TH-positivas en el ATV, lo que disminuirá la liberación estimulada de DA en la corteza frontal de animales asfixiados perinatalmente. El tratamiento con CBZ preservará a las células del ATV y recuperará los niveles de liberación de DA para acercarlos a lo normal.

6. Objetivo General:

Evaluar la vía dopaminérgica mesocortical en función del número de células TH-positivas en el ATV y la liberación estimulada de DA en la corteza frontal, en animales asfixiados en etapa perinatal y tratados con CBZ.

6.1. Objetivos específicos:

1.- Estimar la cantidad de células TH-positivas en el ATV de ratas de 30 días de edad, con asfixia perinatal y tratadas de forma crónica con CBZ.

2.- Evaluar la liberación estimulada de DA en la corteza frontal de ratas de 30 días de edad, con asfixia perinatal y tratadas de forma crónica con CBZ.

7. Materiales y métodos

7.1. Grupos experimentales: se obtuvieron ratas machos de la cepa Wistar recién nacidos, ajustando las camadas a 8 animales, para asegurar que las condiciones alimentarias de todos los individuos sean semejantes. A los 11 días posnatales (DP) se formaron los siguientes grupos experimentales:

- Control intacto: permanecieron todo el tiempo con la madre.
- CBZ: se les administró una dosis diaria de carbamazepina, del DP 15 al DP 30, con una dosis de 50 mg/kg de peso, por vía oral.
- Asfixiado: se indujo la asfixia en cámara sellada, con una mezcla de O₂ al 8% y Nitrógeno al 92%, durante 40 minutos.
- Asfixiado + Carbamazepina: animales asfixiados a los que se les administró una dosis diaria de carbamazepina, del DP 15 al DP 30, con una dosis de 50 mg/kg de peso, por vía oral.

A los 30 DP se tomaron animales de todos los grupos para los siguientes procedimientos:

7.2. Cirugía estereotáxica: para lo cual los animales se anestesiaron con Isoflurano y O₂ (Lisorane, Baxter) por inhalación. Se les colocó una cánula guía para la implantación de la sonda de microdiálisis (CMA) en la corteza frontal (coordenadas: +3.2 Antero Posterior (APs), -2.8 Lateral (L) y -3 Vertical (V), de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1998). Esta cánula guía se sujetó con acrílico dental al cráneo, para posteriormente introducir a través de ella una sonda de microdiálisis (CMA 7) conectada a tubería de teflón, por la cual se fluyó solución

Krebs-ringer oxigenada, a un flujo de 2.5 μ L por minuto. Una vez terminada la cirugía, se retiró la anestesia, y se colocó al animal a una caja de registro, en donde permaneció durante dos horas para recuperarse totalmente de la anestesia. Pasado este tiempo se inició la colecta de fracciones de dialisado cerebral a través de la tubería conectada a la sonda, tomando una muestra cada 3 minutos, en un volumen igual de solución antioxidante (Metabisulfito de sodio 0.4mM en ácido perclórico 0.1M) durante los siguientes 39 minutos. Las fracciones 1 y 2 se colectaron en condiciones basales; las fracciones 3 y 4 se colectaron bajo infusión de 4-aminopiridina (4-AP, en una disolución de 2 mg de 4-Ap en 1 ml de la solución Krebs-ringer, suministrando un total de 15 μ g de 4-AP al cerebro del animal), para estimular la liberación de neurotransmisores. A partir de la fracción número 5 y hasta la 13, la colecta se realizó en condiciones de Krebs-ringer. Una vez terminada la colecta, los animales se sacrificaron por perfusión intracardiaca con NaCl al 9% y paraformaldehído al 4%, se extrajeron los cerebros para hacer cortes histológicos y se tiñeron con violeta de cresilo para verificar la posición de la sonda de microdiálisis. Las muestras de dialisado se guardaron a -4°C hasta el día de su determinación por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (HPLC).

- 7.3.** Determinación cromatográfica de DA y DOPAC: se utilizó un sistema de Cromatografía líquida de alta presión, isocrático, con separación de fase reversa y par iónico, formado por una bomba HPLC 515 (Waters), una columna Xterra RP 18 de partícula de 5 μ m (Waters), un detector

electroquímico LC-4C (BAS), con un potencial de oxidación de 0.5 V. La elución de DA y DOPAC se realizó con un amortiguador que contiene Octosulfonato 2.2 M, Fosfato de Sodio 14.7 mM, Citrato de Sodio 30 mM y Etilendinitrilotetracetato (EDTA) 0.027 mM, a un pH de 3.5. La señal del detector se digitalizó a través del Software eDAQ Power Chrom versión 2.5, y la estimación de la cantidad de neurotransmisor en las fracciones de dialisado se calculó de acuerdo a curvas de calibración realizadas con estándares de concentración conocida.

7.4. Inmunohistoquímica: los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal, y se perfundieron con solución salina al 9% y paraformaldehído al 4%. Se extrajeron los cerebros completos, colocándolos para su post-fijación en la misma solución fijadora por 24 horas adicionales. Posteriormente se cortaron en rebanadas de 40 μm en un vibratomo, a la altura del ATV. Se obtuvieron 8 rebanadas de cada animal (área total de aproximadamente 4 mm^3 , que constituyen toda el ATV de los animales). Estas rebanadas se utilizaron para la detección inmunohistoquímica, cuyo procedimiento fue el siguiente: se colocaron las rebanadas en borohidruro de sodio al 1% durante 5 minutos, para aumentar la permeabilidad de las membranas; después se enjuagaron 3 veces por 5 min en amortiguador de Na_2HPO_4 1M (pH 7.4 ajustado con NaH_2PO_4) con tritón al 0.5%. Enseguida se colocaron en una solución de H_2O_2 al 0.3% para inactivar la peroxidasa endógena, y se enjuagó nuevamente 3 veces por 5 min en amortiguador de Na_2HPO_4 1M. Después las rebanadas se colocaron en suero normal de

caballo (Dilución 1:1000, Vectastain) durante 30 minutos, y enseguida en una solución de anticuerpo policlonal anti-TH (anti-conejo, dilución 1:1000 en amortiguador de Na_2HPO_4 1M+Tritón 0.1%+Azida de sodio 0.01%, ABCAM) en donde permanecieron 12 horas, a 4°C. Luego se retiró el anticuerpo anti-TH y se enjuagaron las rebanadas 3 veces por 5 min en amortiguador de Na_2HPO_4 1M + Tritón 0.1%. Enseguida se colocaron en la solución de anticuerpo secundario (Universal biotinilado, dilución 1:200 en amortiguador de Na_2HPO_4 1M+Tritón 0.1%+Azida de sodio 0.01%, Vector) por 12 horas a 4°C. Después se realizaron lavados 3 veces por 5 min en amortiguador de Na_2HPO_4 1M + Tritón 0.1%. Se añadió una solución de complejo avidina-biotina (ABC, Vector, preparado de acuerdo a las instrucciones del kit) durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante; se enjuagaron 3 veces por 5 minutos con amortiguador de Na_2HPO_4 1M. Los complejos formados se revelaron con diaminobenzidina (DAB) hasta el desarrollo de coloración visible. Las rebanadas de tejido se lavaron con agua destilada y se colocaron en portaobjetos cubiertos con gelatina al 0.1%, manteniéndose en cámara húmeda hasta su adhesión total. Una vez adheridos los tejidos, los portaobjetos se sometieron a un proceso de deshidratación por medio de alcohol etílico del 70 al 100%, seguido de inmersión en xilol y colocación de un cubreobjetos con resina sintética.

- 7.5.** Conteo de células: para la estimación del número de células TH^+ en el ATV, se tomaron fotografías digitales de 8 rebanadas de cada animal

con una cámara Nikon 55i, a través del objetivo de 40x de un microscopio Olympus y del software NIS Elements, las cuales contenían toda la región de interés. Los números resultantes corresponden a las células encontradas en el área de interés de las 8 rebanadas, y se expresaron como media \pm DE de cada grupo, en un área total de 4mm³ (esto representa el área total de ATV de cada animal).

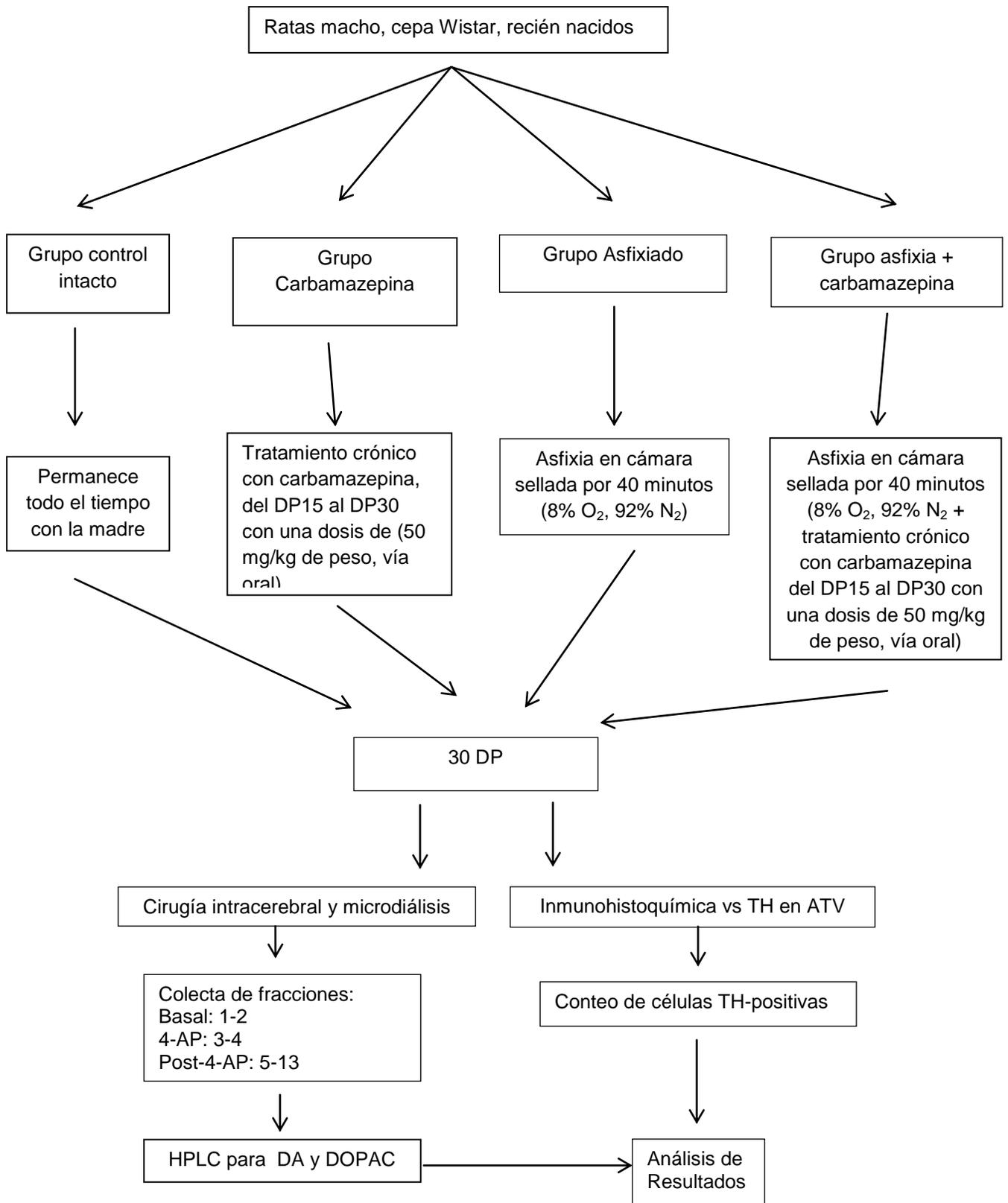
7.6. Análisis de resultados.

Los resultados de los conteos de células se expresaron como media \pm DE para cada grupo experimental. En todos los casos las diferencias entre los grupos se estimaron mediante una prueba de ANOVA con prueba *post hoc* de Tukey. Los resultados de liberación basal de DA se expresaron en porcentaje de la concentración basal, considerando el promedio de las dos primeras fracciones como el 100%. Se graficaron como curso temporal, donde cada punto representa el promedio \pm DE de las muestras de todos los animales de un mismo grupo en cada fracción. Se realizaron las siguientes comparaciones:

- a) Entre periodos basales de cada grupo, mediante ANOVA con prueba *post-hoc* de Tukey, para las gráficas de concentración basal.
- b) Entre el periodo basal (antes de la 4-AP) y los periodos subsecuentes (durante la 4-AP y después de la 4-AP) de cada grupo, mediante ANOVA de una vía con prueba *post-hoc* de Tukey.

En todos los casos, se tomaron las diferencias como significativas cuando $p < 0.05$.

7.7. Diagrama experimental



8. Resultados

8.1 Localización y morfología de células del ATV

Para la ubicación del ATV, se localizó primero la posición de la sustancia negra en la rebanada de tejido, y se tomaron las células entre ambas sustancias negras para el conteo (Figura 6A). En la figura se observa el citoplasma y las prolongaciones principales teñidas, lo que permite apreciar la morfología bipolar típica de este grupo neuronal, con un núcleo grande en posición central (Figura 6B).

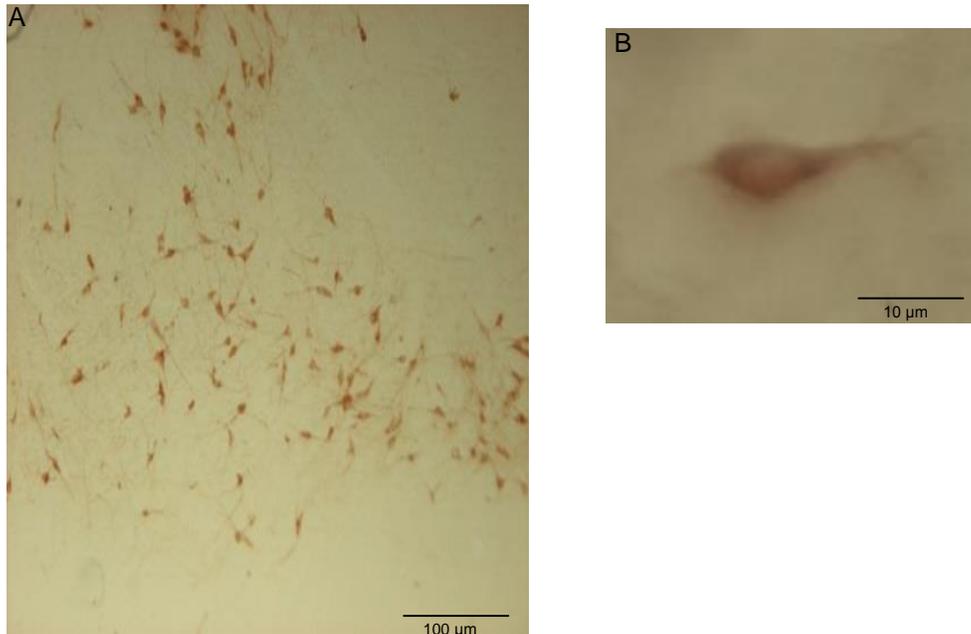
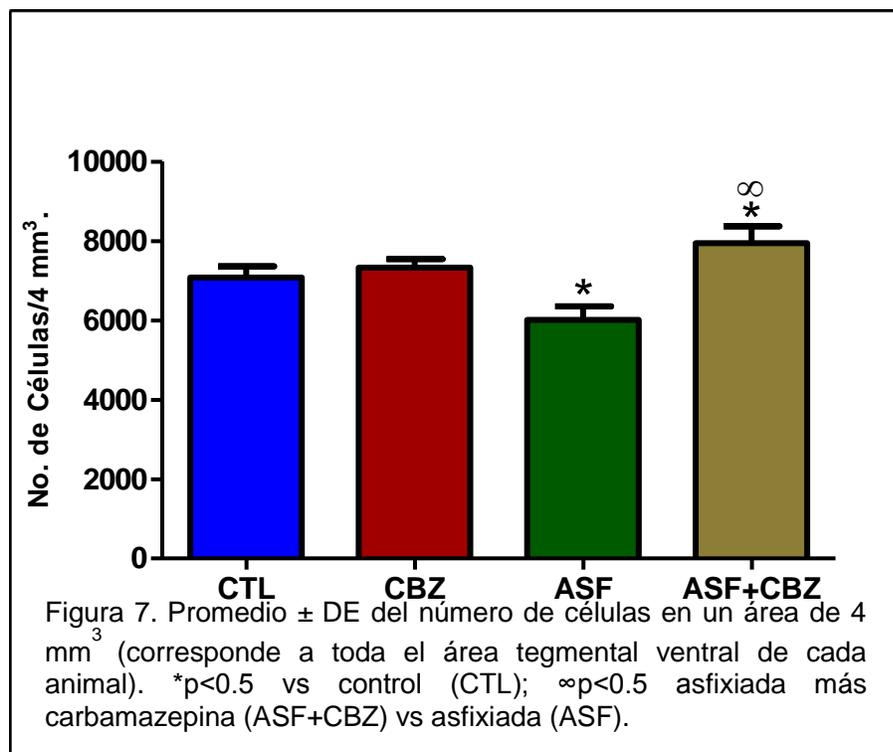


Figura 6. A: imagen representativa de la región del Área tegmental ventral. B: una neurona tirosina hidroxilasa positiva del ATV.

8.2. Conteo de células.

El número promedio de células por rebanada que se cuantificaron para el grupo control fue de 41 ± 1.6 ; para el grupo tratado con CBZ fue de 38 ± 2.3 ; para el grupo ASF fue de 32 ± 1.0 , y para el grupo ASF+CBZ fue de 46 ± 5.6 . El análisis de estos datos muestra una disminución significativa en el grupo ASF con respecto al control, y una recuperación significativa en el grupo ASF+CBZ con respecto al grupo ASF. También se observa un aumento significativo cuando se compara el grupo ASF+CBZ con el grupo control (Fig. 7).



8.3. Concentración basal y liberación por 4-AP de DA

Para la cuantificación cromatográfica de DA y DOPAC, se elaboraron curvas de calibración con soluciones de concentración conocidas de ambos compuestos. Típicamente se utilizaron soluciones de 1.25, 2.5, 5 y 10 nM para ambos compuestos. El perfil de los picos cromatográficos de estas soluciones y el análisis de regresión lineal de una curva representativa, con r^2 de 0.976 para DA y de 0.985 para DOPAC (Fig. 8).

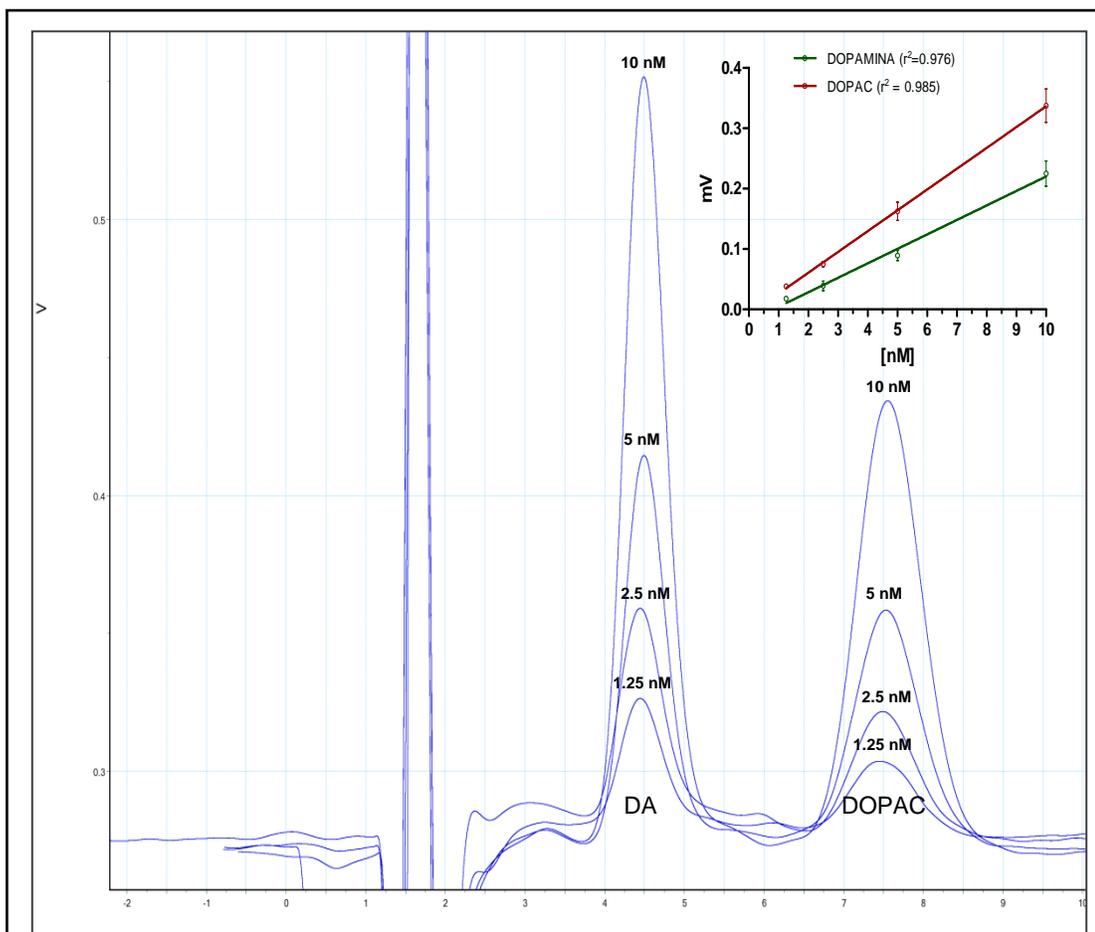
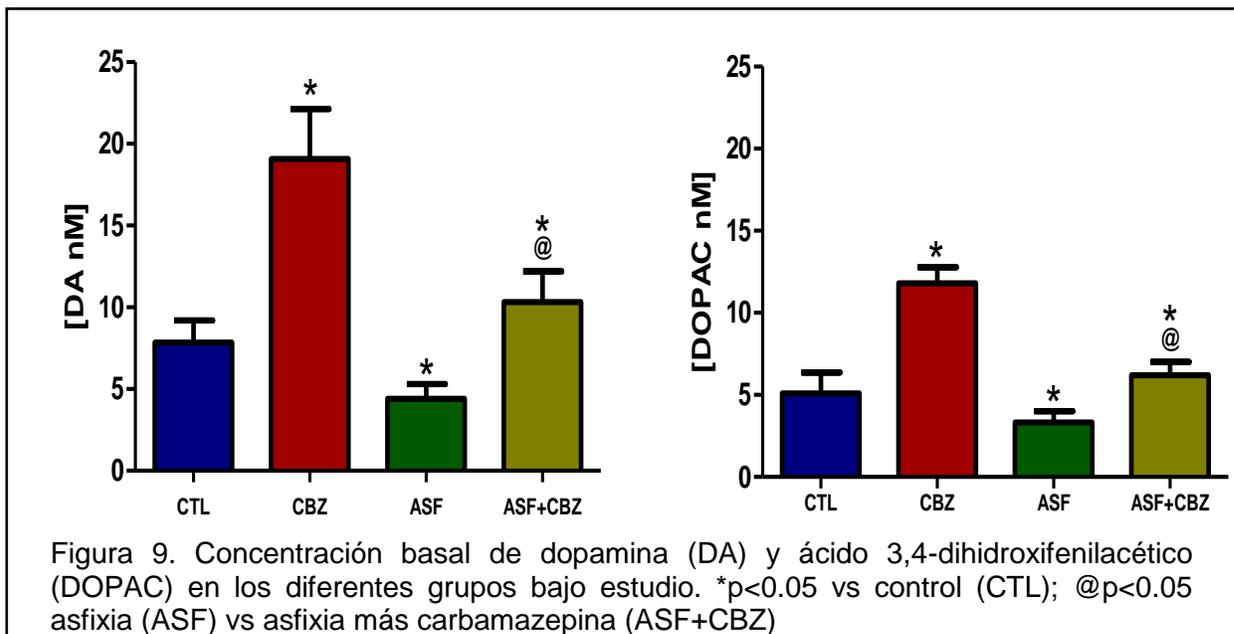


Figura 8. Imagen de los picos cromatográficos de diferentes concentraciones de dopamina (DA) y ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC). En el inserto se observa la línea de regresión de los estándares utilizados en curvas de calibración típicas.

La concentración basal de DA y su metabolito DOPAC en la corteza frontal fue de 7.8 ± 1.3 y 5.09 ± 1.2 nM, respectivamente. Cuando los animales se trataron con CBZ, la concentración basal de DA aumenta a 19.1 ± 3.06 nM, y la de DOPAC a 11.8 ± 0.97 nM, siendo ambos valores significativamente altos con respecto al control intacto (Fig. 9). Los animales del grupo asfixiado, en contraste, muestran una disminución importante con respecto al grupo control, tanto en concentración basal de DA como de DOPAC (4.4 ± 0.89 nM y 3.3 ± 0.69 nM, respectivamente). Cuando se combinó la AP con el tratamiento de CBZ, se observó una recuperación de la concentración basal tanto de DA como de DOPAC, a un nivel por encima del grupo control (10.3 ± 1.8 nM para DA y 6.2 ± 0.81 nM para DOPAC), siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Fig. 9).

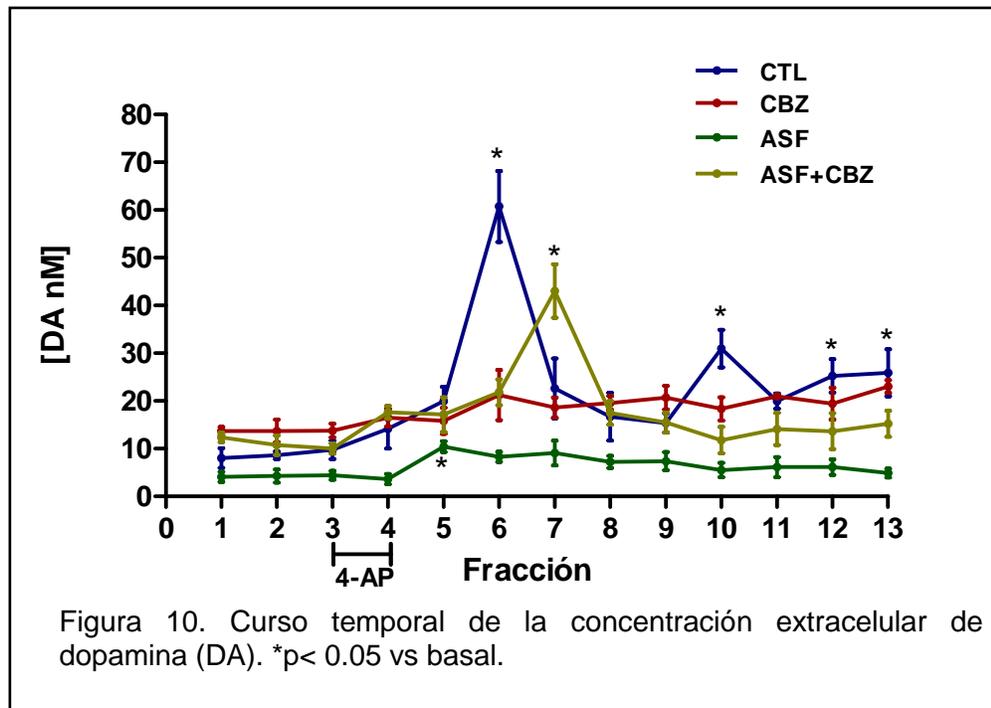


En cuanto al curso temporal, en donde se probó la respuesta de liberación de DA y DOPAC ante un estímulo químico, como fue la administración de la droga 4-aminopiridina, los resultados para DA fueron los siguientes:

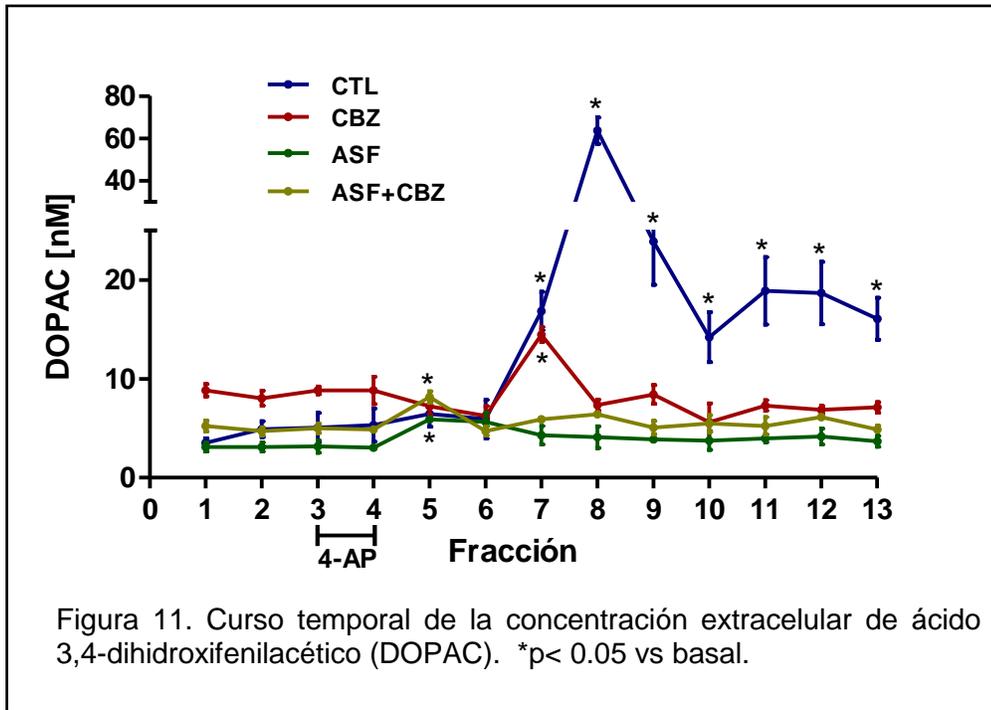
- El grupo control respondió de acuerdo a lo esperado, con una concentración extracelular alta seguida de la aplicación de 4-AP, que representa un aumento de aproximadamente 600% con respecto a la basal de ese grupo.
- El grupo tratado solo con CBZ no mostró respuesta a la 4-AP en comparación con el grupo control, manteniéndose todo el tiempo en el mismo nivel que el valor basal.
- Para el grupo asfixiado se observó un ligero aumento en respuesta a la 4-AP, que aunque fue discreto, si fue estadísticamente significativo con respecto a su basal, pero muy inferior que el grupo control.
- Por último, cuando se administró el tratamiento con CBZ a los animales asfixiados, se observó una recuperación de la DA con 4-AP, representando un aumento aproximado del 400% con respecto a su basal, aunque esta respuesta fue más lenta, y no alcanza el nivel del grupo control (Fig. 10).

Los resultados para DOPAC fueron los siguientes:

- ⊙ En el grupo control se observó una elevación gradual en la concentración extracelular de DOPAC después de 6 minutos de la aplicación de 4-AP, aumento que representa aproximadamente 900% con respecto a la basal de ese grupo. Posteriormente, la concentración extracelular disminuye, pero se mantiene por encima de la basal durante todo el resto del tiempo de colecta.



- ⊙ El grupo tratado con CBZ muestra también un aumento transitorio después de la aplicación de 4-AP, que representa un 170% de aumento, con respecto a su basal, y que vuelve al nivel basal rápidamente.
- ⊙ Para el grupo asfixiado, se observó un ligero incremento, que no es significativamente diferente de la concentración basal.
- ⊙ En el grupo asfixiado tratado con CBZ, se observó un incremento que representa un 50% de aumento con respecto a la basal de ese grupo, pero no alcanza los niveles de respuesta de los grupos controles (Fig. 11).



9. Discusión

En este trabajo se analizó el número de células dopaminérgicas del ATV y la liberación de DA en la corteza frontal, en ratas que fueron asfixiadas a los 11 DP, y que fueron tratadas con CBZ desde los 15 hasta los 30 DP. Encontramos que hay menor cantidad de células TH-positivas en el ATV y una liberación de DA disminuida en la corteza frontal de los animales asfixiados; el tratamiento con CBZ se asoció con un aumento de células TH-positivas en el ATV y una liberación aumentada de DA en la corteza. De acuerdo a búsquedas realizadas durante el desarrollo de éste trabajo no se encontraron reportes donde se analizaran estos parámetros en modelos de asfixia con tratamiento farmacológico.

En cuanto al modelo de asfixia que se utilizó en este trabajo, en varias publicaciones previas se ha probado que la inducción de asfixia en cámara sellada afecta la función cerebral en ratas entre los 10 y los 12 DP, en las cuales se observan temblores de la cabeza y movimientos automatizados de las extremidades posteriores mientras los animales están siendo asfixiados, además de que en la mayoría de ellos aparecen trenes de descargas epileptiformes en el registro EEG, sobre todo en regiones hipocampales (Jensen y cols., 1991; Jensen y cols., 1995; Jensen y Wang, 1996). Aunque en el presente trabajo no se muestran registros EEG de los animales, observaciones previas de nuestro laboratorio (observaciones no publicadas) han corroborado la presencia de trenes de espigas semejantes a los reportados por Jensen y colaboradores, y las manifestaciones conductuales que se observan en los animales mientras están en la cámara de asfixia son muy semejantes a los reportados por Jensen, lo que nos

permite asegurar que se está replicando adecuadamente el modelo de trabajo. Tanto en el grupo de Jensen como en nuestro equipo de trabajo se utilizó animales de 11 días porque está documentado que a esa edad el grado de desarrollo del cerebro de la rata es comparable con el de un recién nacido humano, con base a parámetros bioquímicos y morfológicos ya establecidos (Clancy y cols., 2007).

Los resultados del conteo de células en el ATV muestran una disminución significativa en el grupo asfixiado con respecto del grupo control. Estudios previos encontraron un resultado similar, en animales de 4 semanas que fueron asfixiados mediante la técnica de obtención de cuernos uterinos (Chen y cols., 1995; Chen y cols., 1997), lo que hace evidente la sensibilidad de las neuronas dopaminérgicas a la carencia de oxígeno. En estudios más detallados, en ese mismo modelo, se encontró que las neuronas del cerebelo, estriado y corteza frontal presentan fragmentación nuclear y de la cromatina a partir de los 10 minutos y aún hasta los 8 días posteriores a la asfixia (Dell'Anna y cols., 1997); aunque esta observación podría representar un signo de apoptosis normal, que es común en la primera semana de vida de la rata, los autores consideran que una parte de la apoptosis si se relaciona con la asfixia, específicamente con excitotoxicidad durante la AP, dado que la encontraron más pronunciada en animales con más tiempo de asfixia. En apoyo a esto, se reportaron concentraciones elevadas de Glu durante la asfixia en ratas neonatas, manteniéndose significativamente elevadas al menos por 2 horas después de la asfixia (López-Pérez y cols., 2012), lo que lleva a pensar que se están activando receptores para Glu durante ese tiempo, y por lo tanto debe haber una entrada de Ca^{2+} al citoplasma (Szatkowski y Attwell, 1994;

Arundine y Tymianski, 2003) que finalmente podría ser el responsable del daño al DNA nuclear. Aunque no se ha demostrado que específicamente en el ATV sucedan estos procesos, especulamos que esto sea la causa por la cual encontraron menos células en esa región en los animales de 30 días.

En el caso de los animales controles a los que se les suministró CBZ, no se presentó un cambio significativo en el número de células del ATV, lo que indica que por sí misma, la CBZ no parece tener efecto sobre el número de esas neuronas. En contraste con este resultado, se encontró que en los animales asfixiados y tratados con CBZ se produce un aumento en el número de células TH⁺, aun por encima del grupo control. Como se mencionó anteriormente, la CBZ bloquea el canal de sodio (Kuo y cols., 1997), lo que también inhibe la excitabilidad neuronal (Smith y col., 2011); es probable que la presencia de CBZ a largo plazo este disminuyendo la excitabilidad neuronal que se produce por exceso de Glu en el espacio extracelular durante e inmediatamente después de la AP, y por lo tanto promueva la permanencia de las células. De igual forma, puede estar inhibiendo la muerte celular normal que se observa durante el desarrollo posnatal del SNC, dando un conteo celular superior al control, aunque este último punto es una suposición que no ha sido analizada.

En la segunda serie de experimentos, los trabajos muestran una disminución significativa en la liberación basal de DA y DOPAC (56 y 64 %, respectivamente) en la corteza frontal de los animales asfixiados en comparación con el grupo control; resultados similares fueron encontrados en trabajos previos, en animales de 30 días con AP por obtención de cuernos uterinos, en los cuales se midió DA por microdiálisis en varias regiones subcorticales, y se encontró una disminución

generalizada en el nivel extracelular de DA, aunque en el caso de DOPAC se observaron aumentos o disminuciones dependiendo de la región (Loidl y cols., 1994; Ungethüm y cols., 1996; Chen y cols., 1997), aunque no se han reportado datos de liberación de DA en la corteza frontal bajo condiciones de asfixia. Ésta disminución puede ser una consecuencia directa de la baja en el conteo celular en el ATV encontrada en este trabajo, ya que podría haber menos axones en la corteza frontal que estén liberando DA; en apoyo de esto, Morales y colaboradores (2003), encontró en cultivos de células provenientes de animales asfixiados una conectividad menor entre neuronas TH⁺ de la SN/ATV con células de la corteza frontal, y Brust y colaboradores (1999), reportó que la enzima descarboxilasa de los ácidos aromáticos, que es la última enzima en la síntesis de DA, tienen una menor actividad en la corteza frontal de cerdos asfixiados. Otro estudio mostró alteraciones en la morfología y en el número de sinapsis en el estriado y en el hipocampo de animales asfixiados (Cebal y Loidl, 2011) resultados que en conjunto evidencian que la AP genera una menor disponibilidad de DA en los sitios donde hay terminales dopaminérgicas en el SNC.

La CBZ tuvo un efecto a la alta sobre la concentración basal tanto de DA como de DOPAC. Trabajos previos realizados en animales adultos intactos, mediante diálisis en hipocampo y diversas subregiones de la corteza cerebral, demostraron que al suministrar CBZ sin que existiera una patología previa, se observa un aumento en la liberación de DA proporcional a la dosis administrada del fármaco (Ichikawa 1999; Yamamura y cols., 2009). La recuperación en la concentración basal de DA y DOPAC se puede relacionar con el aumento de células TH⁺ que observamos en el grupo asfixiado tratado con CBZ en este mismo trabajo.

Para analizar la liberación de DA en animales intactos de 30 días, se utilizó el compuesto 4-aminopiridina (4-AP), un inhibidor selectivo de los canales de potasio activados por voltaje, y que se ha utilizado ampliamente para inducir crisis epileptiformes en modelos animales (Medina-Ceja y cols., 2008; Morales-Villagrán y cols., 2008); se cree que es capaz de atravesar la membrana citoplasmática y unirse al canal por el lado citoplasmático (Choquet y Horn, 1991), impidiendo así la repolarización de la membrana, lo que resulta en un aumento de la liberación de neurotransmisores, de forma inespecífica. En este trabajo se utilizó una dosis subconvulsiva de 4-AP (Lévesque y cols., 2012), de forma que se facilitara la liberación de neurotransmisores pero no la aparición de crisis epileptiformes, por lo que los animales no mostraron características epileptiformes. En cuanto a la liberación de DA y DOPAC en los animales intactos, observamos un aumento tanto en DA como en DOPAC pocos minutos después de iniciar la infusión de la droga por diálisis inversa en la misma zona de colecta, resultado que era el esperado. El grupo tratado con CBZ no mostró aumento en la liberación de DA en respuesta al estímulo con 4-AP, pero sí una liberación discreta en DOPAC; esto podría reflejar la disminución en la excitabilidad neuronal por el bloqueo a largo plazo de los canales de Na^+ sensibles al voltaje, efecto que se sabe tiene la CBZ sobre las neuronas (Ambrósio y cols., 2001), además considerando que los canales de K^+ están temporalmente bloqueados por la 4-AP, es posible que esos dos fenómenos independientes resulten en la falta de respuesta al estímulo químico que estamos observando en el caso de la concentración de DA. El pequeño aumento en el nivel de DOPAC podría explicarse por una disminución momentánea en la recaptura de DA asociada con la presencia de CBZ (Huang y

cols., 1994) por lo que es probable que lo que estemos observando sea la degradación de la DA presente en el espacio extracelular antes de iniciar la aplicación de 4-AP, que no está siendo recapturada con la eficiencia normal.

En los animales asfixiados el nivel de DA y de DOPAC fueron igualmente bajos, dato que es semejante a lo encontrado previamente por otros autores, en los cuales se observó que la asfixia tiene este efecto en varias regiones del SNC (El-Khodor y Boksa, 1997; Bustamante y cols., 2007; Akopian y cols., 2008) lo que puede ser resultado de la pérdida parcial de la conectividad entre regiones (Morales y cols., 2003) y la desorganización estructural de la sinapsis (Cebral y Loidl, 2011) relacionados con anoxia. Por último, al estar presente la CBZ en el grupo de animales asfixiados, se observó una respuesta en la liberación de DA después del estímulo con 4-AP, aunque este incremento tardó más en aparecer y fue más pequeño que lo encontrado en el grupo control. No observamos la misma respuesta en el nivel de DOPAC, que continuó tan bajo como en el grupo asfixiado. Este resultado también puede relacionarse con lo encontrado en el número de células TH⁺ en el ATV y apoya la idea de que la CBZ protege al SNC del daño a largo plazo por AP, probablemente a través de la disminución en la hiperexcitabilidad inicial que se da al momento de la asfixia, y por lo tanto es posible que se preserve en cierta medida tanto la conectividad entre núcleos cerebrales como la integridad sináptica y la síntesis de DA, lo que nos permite observar una respuesta parcial al estímulo con 4-AP.

Los resultados sugieren que a través de disminuir a largo plazo la neurotransmisión dopaminérgica en el circuito mesocortical, la AP podría participar en la generación de anomalías funcionales que alteran las capacidades cerebrales

relacionadas con este circuito en los individuos afectados. También pudimos observar que un fármaco como la CBZ, que se utiliza generalmente como antiepiléptico, aunque también puede funcionar como tratamiento de episodios de manía y depresión, tuvo un efecto protector a nivel celular en la región del ATV analizada en este trabajo.

10. Conclusiones

- La AP disminuye la presencia de células TH+ en el ATV de la rata; un tratamiento crónico con CBZ después de la AP muestra un efecto protector.

- La AP disminuye la concentración basal de DA y DOPAC en la corteza frontal de la rata, cuando se miden en etapa juvenil (30 DP); en los animales tratados con CBZ se observó la recuperación del nivel basal tanto de DA como de DOPAC.
- La AP afecta la liberación estimulada de DA y DOPAC en animales en etapa juvenil, mientras que el tratamiento con CBZ recupera parcialmente la liberación estimulada de DA pero no la de DOPAC.
- En general, los resultados de este trabajo muestra que el funcionamiento del sistema dopaminérgico puede afectarse a largo plazo en casos de AP, y que un tratamiento con CBZ podría ayudar a preservar parcialmente el funcionamiento de este sistema de neurotransmisión.

11. Perspectivas

- Analizar la actividad de la enzima descarboxilasa de los ácidos aromáticos, que es la última en la vía biosintética de la DA, y que teóricamente se

encuentra en las terminales corticales, así como la función y expresión del transportador para DA en esa región, pues no sabemos si éstos tienen deficiencias atribuibles a la AP.

- Estudiar los efectos sobre la memoria de trabajo en estos animales, pues se sabe que la DA cortical es importante en ese tipo de memoria, y no sabemos si nuestros animales presentan anomalías en ese tipo de funciones.

12. Referencias

- Acker T., Acker H. 2004. *Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications*. **J. Exp. Biol.** **207:3171-3188**.

- Akopian G., Crawford C., Beal M., Cappelletti M., Jakowec M., Petzinger G., Zheng L., Gheorghe S., Reichel C., Chow R., Walsh J. 2008. *Decreased striatal dopamine release underlies increased expression of long-term synaptic potentiation at corticostriatal synapses 24 h after 3-nitropropionic-acid-induced chemical hypoxia.* **J. Neurosci.** **28:9585-9597.**
- Ambrósio A., Silva A., Malva J., Soares-da-Silva P., Carvalho A., Carvalho C. 2001. *Inhibition of glutamate release by BIA 2-093 and BIA 2-024, two novel derivatives of carbamazepine, due to blockade of sodium but not calcium channels.* **Biochem. Pharmacol.** **61:1271-1275.**
- Arundine M., Tymianski M. 2003. *Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury.* **Cell Mol. Life Sci.** **61:657-668.**
- Awasthi Y., Ansari G., Awasthi S. 2005. *Regulation of 4-hydroxynonenal mediated signaling by glutathione S-transferases.* **Methods Enzymol.** **401:379-407**
- Badawi N., Kurinczuk J., Hall O., Field O., Pemberton P., Stanley F. 1997. *Newborn encephalopathy in term infants: three approaches to population-based investigation.* **Semin. Neonatol.** **2:181-188.**
- Bae H., Park Y., Kim Y., Moon D., 2013. *Stevens-Johnson syndrome induced by carbamazepine treatment in a patient who previously had carbamazepine induced pruritus - a case report.* **Korean J. Pain** **26:80-83.**
- Bahena T., Flores G., Arias-Montaña J. 2000. *Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central.* **Rev. Biomed.** **11:39-60.**
- Barr M. 1979. *Spinal Cord, En The Human Nervous System, 3ra Edición.* Harper and Row Ed. Philadelphia.
- Beal M., Brouillet E., Jenkins B., Ferrante R., Kowall N., Miller J., Storey E., Srivastava R., Rosen B., Hyman B. 1993. *Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid.* **J. Neurosci.** **13:4181-4192.**
- Brust P., Bauer R., Vorwieger G., Walter B., Bergmann R., Füchtner F., Steinbach J., Zwiener U., Johannsen B. 1999. *Up regulation of the Aromatic Amino Acid Decarboxylase under Neonatal Asphyxia.* **Neurobiol. Dis.** **6:131-139.**
- Bustamante D., Morales P., Pereyra J., Goiny M., Herrera-Marschitz M. 2007. *Nicotinamide prevents the effect of perinatal asphyxia on dopamine release evaluated with in vivo microdialysis 3 months after birth.* **Exp. Brain Res.** **177:358-369.**
- Cebral E., Loidl C. 2011. *Changes in neostriatal and hippocampal synaptic densities in perinatal asphyctic male and female young rats: role of hypothermia.* **Brain Res Bull.** **84:31-38.**

- Chen Y., Engidawork E., Loidl F., Dell'Anna E., Goiny M., Lubec G., Andersson K., Herrera-Marschitz M. 1997. *Short- and long-term effects of perinatal asphyxia on monoamine, amino acid and glycolysis product levels measured in the basal ganglia of the rat.* **Dev. Brain Res.** **104:19-30.**
- Chen Y., Ogren S., Bjelke B., Bolme P., Eneroth P., Gross J., Loidl F., Herrera-Marschitz M., Andersson K. 1995. *Nicotine treatment counteracts perinatal asphyxia-induced changes in the mesostriatal/limbic dopamine systems and in motor behaviour in the four-week-old male rat.* **Neuroscience** **68:531-538.**
- Clancy R., Zheng P., O'Mahony M., Izmirly P., Zavadil J., Gardner L., Buyon J.P. 2007. *Role of hypoxia and cAMP in the transdifferentiation of human fetal cardiac fibroblasts: implications for progression to scarring in autoimmune-associated congenital heart block.* **Arthritis Rheum.** **56:4120-4131.**
- Clinckers R., Smolders I., Michotte Y., Ebinger G., Danhof M., Voskuyl R., DellaPasqua O. 2008. *Impact of efflux transporters and of seizures on the pharmacokinetics of oxcarbazepine metabolite in the rat brain.* **Br. J. Pharmacol.** **155:1127-1138.**
- Counihan T., Landwehrmeyer G., Standaert D., Kosinski C., Scherzer C., Daggett L., Veliçelebi G., Young A., Penney J. 1998. *Expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA in the human brain: mesencephalic dopaminergic neurons.* **J. Comp. Neurol.** **390:91-101.**
- Crook Z., Housman D. 2012. *Dysregulation of dopamine receptor D2 as a sensitive measure for Huntington disease pathology in model mice.* **PNAS** **109:7487-7492.**
- Dell'Anna E., Chen Y., Engidawork E., Andersson K., Lubec G., Luthman J., Herrera-Marschitz M. 1997. *Delayed neuronal death following perinatal asphyxia in rat.* **Exp. Brain Res.** **115:105-115.**
- Dubinsky J., Rothman S. 1991. *Intracellular calcium concentrations during "chemical hypoxia" and excitotoxic neuronal injury.* **J. Neurosci.** **11:2545-2551.**
- El-Khodori B., Boksa P., 1997. *Long-term reciprocal changes in dopamine levels in prefrontal cortex versus nucleus accumbens in rats born by caesarean section compared to vaginal birth.* **Exp. Neurol.** **145:118-129.**
- Esquiliano G., Ramírez I., Tello A., Aguilar C. 2004. *Daño neurológico secundario a hipoxia isquemia perinatal.* **Arch. Neurocién.** **9:2-11.**
- Ferrero E., Fulgenzi A., Belloni D., Foglien C., Ferrero M. 2011. *Cellfood improves respiratory metabolism of endothelial cells and inhibits hypoxia-induced reactive oxygen species generation.* **J. Physiol. Pharmacol.** **62 :287-293.**
- Florez J., Pazos A. 2003. *Neurotransmisión en el Sistema Nervioso Central. En Farmacología Humana. 4ta Edición, Jesús Flórez (Editor), Masson S.A. Massachusetts.*

- Freeman I. 1985. *Report on causes of mental retardation and cerebral palsy. Special Article. Pediatrics 76:457–458.*
- Fuxe K. 1965. *Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. IV. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. Acta Physiol. Scand. 64:37-85.*
- Gandhi S., Vaarmann A., Yao Z., Duchen M., Wood N., Abramov A. 2012. *Dopamine induced neurodegeneration in PINK1 model of Parkinson's disease. Plos One 7:1-11*
- Grima B., Lamouroux A., Blanot F., Biguet N. F., Mallet, J. 1985. *Complete coding sequence of rat tyrosine hydroxylase mRNA. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 82:617–621.*
- Grzesiak A., Lang M., Kim K., Matzger A. 2003. *Comparison of the four anhydrous polymorphs of carbamazepine and the crystal structure of form I. J. Pharm. Sci. 92:2260-2271.*
- Hawkins, Catherine A., Jane M., Brown J. 1985. *Antiepileptic and anti-amnesic effect of carbamazepine in experimental limbic epilepsy. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 48:459-468.*
- http://www.csg.salud.gob.mx/interiores/cb_cat/medicamentos/cbycat_med/15_neuro.pdf. Cuadro básico de medicamentos neurológicos de la SSA, México.
- <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/meds/a682237-es.html>, página actualizada el 28 de Agosto de 2013.
- <http://www.sinais.salud.gob.mx>. Boletín de Información Estadística No. 28, 2008. Volumen II: Daños a la Salud. Primera edición, México D.F.
- Huang C., Lajevardi N., Tammela O., Pastuszko A., Delivoria-Papadopoulos M., Wilson D. 1994. *Relationship of extracellular dopamine in striatum of newborn piglets to cortical oxygen pressure. Neurochem. Res. 19:649-655.*
- Ichikawa J., Meltzer H. 1999. *Valproate and carbamazepine increase prefrontal dopamine release by 5-HT_{1A} receptor activation. Eur. J. Pharmacol. 380:1-3.*
- Jensen F. 2002. *The role of glutamate receptor maturation in perinatal seizures and brain injury. Int. J. Devl. Neuroscience 20:339–347.*
- Jensen F., Applegate C., Holtzman D., Belin T., Burchfiel J. 1991. *Epileptogenic effects of hypoxia on immature rodent brain. Ann. Neurol. 29(6):629-637.*
- Jensen F., Fircunsky I., Mower G. 1993. *Differences in c-fos immunoreactivity due to age and mode of seizure induction. Brain Res Mol Brain Res. 17:185-93.*
- Jensen F., Wang C. 1995. *Hypoxia-induced hyperexcitability in vivo and in vitro in the immature hippocampus. Epilepsy Res. 26:131-140.*
- Jensen F., Wang C. 1996. *Hypoxia-induced hyperexcitability in vivo and in vitro in the immature hippocampus. Epilepsy Research 26:131-140.*

- Kadam S., Dudek F. 2007. *Neuropathological features of a rat model for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy with associated epilepsy*. **Comp. Neurol.** **505:716-737**.
- Kandel E. 2000. *Nerve cells and behavior*. En Principles of Neural Science, 4ta Edición. (Eric C. Kandel, James H. Schwartz y Thomas M. Jessell Editores), Mc Graw Hill, New York, pp 20-25.
- Kuo C., Chen R., Lu L., Chen R. 1997. *Carbamazepine inhibition of neuronal Na⁺ currents: quantitative distinction from phenytoin and possible therapeutic implications*. **Mol. Pharmacol.** **51:1077-1083**.
- Lamouroux A., Vigny A., Faucon Biguet N., Darmon M., Franck R., Henry J., Mallet J. 1987. *The primary structure of human dopamine-beta-hydroxylase: insights into the relationship between the soluble and the membrane bound forms of the enzyme*. **EMBO J.** **6:3931-3937**.
- Lee G., Dallas S., Hong M., Bendayan R. 2001. Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacol Rev.* 53(4):569-96.
- Lehotský J., Kaplán P., Matejovièová M., Murín R., Raèay P., Raeymaekers L. 2002. *Ion transport systems as targets of free radicals during ischemia reperfusion injury*. **Gen. Physiol. Biophys.** **21:31-37**.
- Lévesque M., Salami P., Behr C., Avoli M. 2012. *Temporal lobe epileptiform activity following systemic administration of 4-aminopyridine in rats*. **Epilepsia.** **54:596-604**.
- Levi N., Bastuji-Garin S., Mockenhaupt M., Roujeau J., Flahault A., Kelly J., Martin E., Kaufman D. 2009 *Medications as risk factors of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in children: a pooled analysis*. **Pediatrics** **123:297-304**.
- Levitt M., Spector S., Sjoerdsma A., Underfriend S. 1965. *Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart*. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **148:1-8**.
- Li C., Jackson R. 2002. *Reactive species mechanisms of cellular hypoxia reoxygenation injury*. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.** **282:227-241**.
- Lipkind G., Fozzard H., Hanck D. 2011. *A molecular model of the inner pore of the Ca channel in its open state*. **Channels (Austin)** **5:482-8**.
- Loane J., Byrnes K. 2010. *Role of microglia in neurotrauma*. **Neurotherapeutics**, **7: 366–377**.
- Lodge J., Grace A. 2011. *Hippocampal dysregulation of dopamine system function and the pathophysiology of schizophrenia*. **Trends Pharmacol. Sci.** **32:507-513**.
- Loidl C., Herrera-Marschitz M., Andersson K., You Z., Goigny M., O'Connor W., Silveira R., Rawal R., Bjelke B., Chen Y. 1994. *Long-term effects of perinatal*

asphyxia on basal ganglia neurotransmitter systems studied with microdialysis in rat. Neurosci Lett. 175:9-12.

- López-Pérez S., Morales-Villagrán A., Ventura-Valenzuela J., Medina-Ceja L. 2012. Short- and long-term changes in extracellular glutamate and acetylcholine concentrations in the rat hippocampus following hypoxia. **Neurochem. Int. 61:258-265.**
- López-Pérez S., Vergara P., Ventura-Valenzuela J., Ureña-Guerrero M., Segovia J., Beas-Zárate C. 2005. *Modification of dopaminergic markers expression in the striatum by neonatal exposure to glutamate during development. Int. J. Dev. Neurosci. 23:335-342.*
- Lorenzo P., Moreno A., Lizasoain I., Leza J., Moro M., Portolés A. 2009. *Farmacología Básica y Clínica. 18va edición. Editorial Médica Panamericana, S.A. pp 246-247.*
- McCormack M., Alfirevic A., Bourgeois S., Farrell J., Kasperaviciute D., Carrington M., Sills G., Marson T., Jia X., de Bakker P., Chinthapalli K., Molokhia M., Johnson M., O'Connor G., Chaila E., Alhusaini S., Shianna K., Radtke R., Heinzen E., Walley N., Pandolfo M., Pichler W., Park B., Depondt C., Sisodiya S., Goldstein D., Deloukas P., Delanty N., Cavalleri G., Pirmohamed M. 2011. *HLA-A*3101 and carbamazepine-induced hypersensitivity reactions in Europeans Engl. J. Med. 364:1134-43.*
- Medina-Ceja L., Cordero-Romero A., Morales-Villagrán A. 2008. *Antiepileptic effect of carbenoxolone on seizures induced by 4-aminopyridine: a study in the rat hippocampus and entorhinal cortex. Brain Res. 1187:74-81.*
- Miranda A., Boegman R., Beninger R., Jhamandas K. 1997. *Protection against quinolinic acid-mediated excitotoxicity in nigrostriatal dopaminergic neurons by endogenous kynurenic acid. Neuroscience 78:967-975.*
- Morales I., Sabate M., Rodríguez M. 2013. *Striatal glutamate induces retrograde excitotoxicity and neuronal degeneration of intralaminar thalamic nuclei: their potential relevance for Parkinson's disease. Eur. J. Neurosci. 38:2172-2182.*
- Morales P., Klawitter V., Johansson S., Huaiquín P., Barros V., Avalos A., Fiedler J, Bustamante D, Gomez-Urquijo S, Goiny M, Herrera-Marschitz M. 2003. *Perinatal asphyxia impairs connectivity and dopamine neurite branching in organotypic triple culture from rat substantia nigra, neostriatum and neocortex. Neurosci. Lett. 348:175-179.*
- Morales-Villagrán A., Sandoval-Salazar C., Medina-Ceja L. 2008. *An analytical flow injection system to measure glutamate in microdialysis samples based on an enzymatic reaction and electrochemical detection. Neurochem. Res. 33:1592-1598.*
- Nagatsu T., Levitt M., Uderfriend S. 1964. *Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis. J. Biol. Chem. 239:2910-2917.*

- Nakajima W., Ishida A., Takada G. 1999. *Anoxic and hypoxic immature rat model for measurement of monoamine using in vivo microdialysis*. **Brain Res. Prot.** **3:252-256**.
-
- Paxinos G., Watson C. 1997. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 3ra Edición. Academic Press. California, USA.
- Peters A., Palay S., Webster H. 1991. *The fine structure of the nervous system: the cells and their processes*. New York: Oxford University Press, pp167.
- Powell G., Saunders M., Marson A. 2010. *Immediate-release versus controlled-release carbamazepine in the treatment of epilepsy*. **Cochrane Database Syst. Rev.** **20:CD007124**.
- Resendiz-Aparicio J., Rodríguez-Rodríguez E., Rivera-Quintero J., Cruz-Martínez E., Aguirre-García E. 2007. *Guía Clínica de Epilepsia. Guías Clínicas del Hospital Psiquiátrico Infantil "Dr. Juan N. Navarro"*, Secretaría de Salud, México. CENETEC .México, D.F.
- Rothman S. 1984. *Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death*. **J. Neurosci.** **4:1884-1891**.
- Ruiz-Extrema A., Robles-Vizcaino C., Benitez M., Ocete E., Lainez C., Benitez A. 2001. *Neurodevelopment of neonates in neonatal intensive care unit and grown of surviving infants at age 2 years*. **Early Hum. Develop.** **65:119-132**.
- Sabban E. 1996. *Synthesis of dopamine and its regulation*. En *CNS Neurotransmitters and Neuromodulators*. Trevor Stone (Editor), CRC Press. San Antonio, Texas, USA.
- Schindler W., Haflige F. 1954. *Über Derivate des Iminodibenzyls*. **Helv. Chim. Acta** **37:472-483**.
- Selivanov V., Votyakova T., Pivtoraiko V., Zeak J., Sukhomlin T., Trucco M., Roca J., Cascante M. 2011. *Reactive oxygen species production by forward and reverse electron fluxes in the mitochondrial respiratory chain*. **PLoS Comput. Biol.** **7: e1001115**.
- Smith J., Das A., Ray s., Banik N. 2011. *Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases*. **Brain Res Bull.** **87:10-20**.
- Sun J., Xie L., Liu X. 2006. *Transport of carbamazepine and drug interactions at blood-brain barrier*. **Acta Pharmacol. Sin.** **27:249-253**.
- Szatkowski M., Attwell D. 1994. *Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms*. **Trends Neurosci.** **17:359-365**.
- Theile J., Cummins T. 2011. *Inhibition of Nav 4 Peptide-Mediated Resurgent Sodium Currents in Nav1.7 Channels by Carbamazepine, Riluzole, and Anandamide*. **Mol. Pharmacol.** **80:724-734**.

- Tolou-Ghamari Z., Zare M., Habibabadi J., Najafi M. 2013. *A quick review of carbamazepine pharmacokinetics in epilepsy from 1953 to 2012*. **J. Res. Med. Sci.** **18:81-85**.
- Uebachs M., Opitz T., Royeck M., Dickhof G., Horstmann M., Isom L., Beck H. 2010. *Efficacy loss of the anticonvulsant carbamazepine in mice lacking sodium channel subunits via paradoxical effects on persistent sodium currents*. **J. Neurosci.** **30:8489-8501**.
- Ungethüm U., Chen Y., Gross J., Bjelke B., Bolme P., Eneroth P., Heldt J., Loidl C.F., Herrera-Marschitz M., Andersson K. 1996. *Effects of perinatal asphyxia on the mesostriatal/mesolimbic dopamine system of neonatal and 4-week-old male rats*. **Exp. Brain Res.** **112:403-410**.
- Walker M., Howar R., Smith S., Miller D., Shorvon S., Hirsch N. 1996. *Diagnosis and treatment of status epilepticus on a neurological intensive care*. **QJM** **12:913-920**
- Weitzdoerfer R., Pollak A., Lubec B. 2004. *Perinatal asphyxia in the rat has lifelong effects on morphology, cognitive functions and behavior* **Sem. Perinatol.** **28:249-256**.
- Yamamoto S., Tanaka E., Shoji Y., Kudo Y., Inokuchi H., Higashi H. 1997. *Factors that reverse the persistent depolarization produced by deprivation of oxygen and glucose in rat hippocampal CA1 neurons in vitro*. **J. Neurophysiol.** **78: 903–911**.
- Yamamura S., Hamaguchi T., Ohoyama K., Sugiura Y., Suzuki D., Kanehara S., Nakagawa M., Motomura E., Matsumoto T., Tanii H., Shiroyama T., Okada M. 2009. *Topiramate and zonisamide prevent paradoxical intoxication induced by carbamazepine and phenytoin*. **Epilepsy Res.** **84:172-186**.
- Yang Y., Kuo C. 2002. *Inhibition of Na(+) current by imipramine and related compounds: different binding kinetics as an inactivation stabilizer and as an open channel blocker*. **Mol. Pharmacol.** **62:1228-1237**.
- Zhang H., Xie M., Schools G., Feustel P., Wang W., Lei T., Kimelberg H., Zhou M. 2009. *Tamoxifen mediated estrogen receptor activation protects against early impairment of hippocampal neuron excitability in an oxygen/glucose deprivation brain slice ischemia model*. **Brain Res.** **1247:196-211**.