

2008 B – 2013 A

005170826

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**CUANTIFICACIÓN DE GLUTAMATO EN TIEMPO REAL CON UNA ALTA
RESOLUCIÓN TEMPORAL DURANTE LA ACTIVIDAD EPILEPTIFORME**

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

MAYRA LILIANA RAMÍREZ RENTERÍA

Las Agujas, Zapopan, Jal., 12 de Diciembre del 2013

El trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neurofisiología y Neuroquímica adscrito al Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias bajo la dirección de la M. C. Verónica Palomera Ávalos y asesoría del Dr. Alberto Morales Villagrán financiado por el proyecto CONACYT número 105807, titulado: Diseño, construcción e implementación de un sistema automatizado de análisis de neurotransmisores en muestras pequeñas.

DEDICATORIA

El siguiente trabajo es dedicado a lo más preciado que tengo. Mis padres: Felipe Ramírez Orozco y S. Rubisela Rentería Rodríguez, por su apoyo incondicional, confianza, valores y educación transmitida pues sin ellos no habría superado las adversidades para poder alcanzar las metas planteadas a lo largo de mi vida profesional y personal. Gracias a su esfuerzo, amor y dedicación es el motivo por el cual me encuentro donde estoy. A mi padre por demostrarme que en esta vida lo más importante es ser el mejor en cualquier cosa que hagas, así como el compartir todos sus conocimientos con esta su pequeña aprendiz. A mi madre por demostrarme que nunca hay que dejarse llevar por la mediocridad y luchar por ser cada vez mejor, solo espero haber sabido corresponder a sus esfuerzos y ser una hija digna de ellos. Así como a mi madrina Lupita Ramírez quien siempre ha sido como una segunda madre para mi.

Al Dr. Alberto Morales Villagrán por mostrarme lo fascinante que es el mundo de las neurociencias, por demostrarme el valor de la entrega y la pasión por el trabajo, simplemente por ser mi guía desde tercer semestre de la licenciatura hasta hoy en día. Nunca dejaré de agradecer que me permitiera trabajar a su lado.

A mi hermano mayor Toñito por ser un gran ejemplo a seguir y por apoyo incondicional, a mis cuatitos Felipe y Melissa por ser los mejores compañeros durante sus 19 años de existencia, pues ellos le han dado un gran sabor a mi vida.

También dedico este trabajo a Jorge Alberto Gutiérrez Vargas por ser una parte esencial de mi ser, por su paciencia, apoyo y sobre todo por ser mi compañero de viaje en esta aventura. Gracias por ser el amor de mi vida.

A mis abuelos que a pesar de que no se encuentran a mi lado fueron parte irremplazable de mi vida, se que les hubiera gustado ver realizado mi sueño de terminar mi licenciatura. *“Siempre permanecerán en mi mente”*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la vida y más que nada a Dios por los éxitos y obstáculos pues gracias a ellos me han permitido ser lo que soy.

Agradezco de manera muy particular a la M. C. Verónica Palomera Ávalos por darme la oportunidad de trabajar a su lado, compartir sus grandes experiencias y conocimientos tanto personales como laborales. Nunca olvidaré el apoyo que me brindó cuando más lo necesitaba. Y sobre todo por su amistad, su paciencia y su cariño, solo espero haber demostrado mi enorme gratitud, respeto, mi gran afecto y admiración, deseándole el mejor de los éxitos hoy y siempre.

Un agradecimiento especial a la Dra. Silvia Josefina López Pérez por todo su apoyo en mis análisis estadísticos y por aclarar muchas de mis dudas a lo largo de los cuatro años de estancia en el laboratorio.

A mis sujetos experimentales sobre todo a Guduperto por hacer posible el trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por ayudarme en todo momento y hacer muy agradable mi estancia, a Kenia y a Chelito por compartir sus conocimientos, a Lucy y Juan Carlos por siempre hacerme reír, a Jorge Ortega por su afán de corregirme y al chalansito Victor Cifuentes por todas esas buenas conversaciones.

A los profesores que marcaron mi vida, el Luis Burgos por demostrarme que nunca hay que rendirse, Biol. Margarito Mora por apasionarme en el conocimiento, al Dr. Daniel Ortuño por no dejarme caer en la mediocridad, solo espero que nunca cambie su forma de ser, me encantaba su sarcasmo, al Dr. Alberto Ramos por su buen humor y entusiasmo por el trabajo y la enseñanza, al Dr. Miguel Guevara por mostrarme otra visión en el área de las neurociencias y por todo su apoyo.

A los sinodales la Dra Laura Medina, Dra Nidia Carillo, Dr Daniel Ortuño y el Dr. Alberto Morales por su paciencia, comprensión y sobre todo por sus excelentes aportaciones para engrandecer el trabajo.

A mis mejores amigos Susana Azpe, Enrique Hernández y Ricardo Pérez por compartir su esencia, amistad y su apoyo. Simplemente agradezco a todos por ser el tesoro más grande y preciado que tengo.

Así como a mis queridos “gazapos” por haber caminado juntos a través de esta maravillosa experiencia. A Enrique por ser el sostén de una gran amistad, y su apoyo estudiantil aunque nunca se calle, a Ricardo por enseñarme a decir lo que pienso y no dejarme de nadie, a Rosita por ser mi confidente, Fátima por sus locuras, Ana por ser bipolar y a mi querida Peca por enseñarme a no estresarme tanto por las cosas, aunque nunca lo pude hacer. Simplemente mis queridos gazapos les agradezco estos cinco años de aventuras, diversión, complicidad, apoyo, simplemente por nuestra gran amistad éxito a todos mis ñoños.

Un agradecimiento muy especial a mis padrinos Humberto Ramírez, Pilar Chaírez, Leticia Ramírez, Antonio Padilla, José Ramírez y Florentina Peña por estar a mi lado en las buenas y en las malas, compartiendo mis logros y alegrías, apoyándome en los momentos difíciles y por enseñarme a ser una buena persona.

A mi prima favorita Erika Ramírez por ser un gran modelo a seguir y por todo su apoyo a lo largo de mi carrera y del transcurso de mi vida, a sus hermanas Claudita y Adriana por enseñarme cuales son las cosas que en verdad cuentan en la vida, así como a toda mi familia por ser el mejor apoyo que tengo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Epilepsia	1
1.1.1 Clasificación de las crisis epilépticas	2
1.2. Hipocampo	3
1.3. Corteza Entorrinal	6
2. ANTECEDENTES	8
2.1 Neurotransmisión Glutamatérgica	8
2.1.1 Receptores para glutamato	11
2.1.2 Transportadores de Glutamato	12
2.1.3 Papel del Glutamato en la epilepsia.....	14
2.2 Modelos experimentales para el estudio de la epilepsia	14
2.3 Técnicas para medir neurotransmisores	15
2.3.1 Técnica enzimática	18
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
4. JUSTIFICACIÓN	20
5. HIPÓTESIS	21
6. OBJETIVOS	22
6.1. General	22
6.2. Específicos	22
7. DIAGRAMA EXPERIEMENTAL	23
8. MATERIALES Y METODOS	24
8.1 Animales	24

8.2	Cirugía estereotáxica.....	24
8.3	Preparación del reactor enzimático, calibración y cuantificación de Glutamato.....	26
8.4	Determinación del volumen muerto.....	27
8.5	Análisis bioquímico y registro EEG	27
8.6	Análisis estadístico.....	28
9.	RESULTADOS	29
9.1	Cambios en la concentración de glutamato y correlación de la actividad EEG	29
10.	DISCUSIÓN	38
11.	CONCLUSIONES	42
12.	BIBLIOGRAFIA	43

ABREVIATURAS

4- AP	4-aminopiridina
AAT	Aspartato amino-transferasa
AMPA	α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato
Ach	Acetilcolina
AP	Antero posterior
°C	Grados centígrados
Ca ⁺⁺	Calcio
CA	<i>Cornus Ammonis</i>
CE	Corteza entorrinal
Cl ⁻	Cloro
EEG	Electroencefalograma
EAAT	Por sus siglas en inglés <i>Excitatory amino-acid transporters</i>
GABA	Ácido γ - aminobutírico
GD	Giro dentado
GDH	Glutamato deshidrogenasa
Glu	Glutamato
GluOx	Glutamato oxidasa
GS	Glutamina sintetasa
GAD	Glutamato descarboxilasa

GLAST	Transportadores de glutamato/aspartato
GLT	Transportadores de glutamato
GPT	L- glutamato piruvato transaminasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRP	Peroxidasa de rábano
Hz	Herzios
ILAE	Liga Internacional contra la Epilepsia
L	Lateral
mGlu	Receptores metabotrópicos de glutamato
MD	Microdiálisis
MDC	Microdiálisis cerebral
ms	Milisegundos
mv	Milivolts
Na+	Sodio
nm	Nanometros
NMDA	N-metil D- aspartato
NT	Neurotransmisor
NT's	Neurotransmisores
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAG	Glutaminasa de fosfato activo
Para	Parasubiculum

Pre	Presubiculum
SB	Subiculum
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
TBOA	DL- treo-beta-benziloxiaspartato
THA	DL-treo-beta-hidroxiaspartato
UAF	Unidades arbitrarias de fluorescencia
V	Ventral
μM	Micromolar

RESUMEN

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central (SNC) en los mamíferos, está involucrado en diversos procesos fisiológicos como la coordinación motora y la cognición que incluye los procesos de memoria y aprendizaje. Alteraciones en las concentraciones de glutamato se han relacionado con diversas patologías neurológicas como la 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. Aproximadamente 50 millones de personas a nivel mundial padecen de epilepsia. Se han desarrollado modelos experimentales para facilitar la investigación de la epilepsia, los cuales se basan principalmente en mimetizar las crisis epilépticas observadas en el humano.

La aplicación de fármacos como el DL- treo- β -benziloxiaspartato (TBOA) que es un inhibidor de los transportadores de glutamato modifica la función cerebral de los animales y con ello produce actividad epileptiforme semejante a la epilepsia. Debido al papel que desempeña el glutamato en el desarrollo de la epilepsia, es importante conocer en que concentraciones se libera éste neurotransmisor durante la actividad cerebral normal y durante la actividad epileptiforme, para ello es necesario emplear una técnica enzimática que nos proporcione una alta resolución temporal puesto que los procesos bioquímicos se desarrollan en milisegundos.

En los resultados obtenidos en el presente trabajo, se observó que la administración de TBOA y los estímulos eléctricos posteriores a la administración del fármaco producen alteraciones en las concentraciones de glutamato, que se pueden relacionar con la actividad epileptiforme caracterizada por amplitud y frecuencia elevada.

1. INTRODUCCIÓN

La neurotransmisión química es la principal comunicación que existe en las células nerviosas de mamíferos, las sinapsis químicas presentan una serie de eventos pre y post-sinápticos (Siegel y cols., 2006), liberando neurotransmisores (NT's), los cuales actúan a través de receptores específicos en la neurona post-sináptica de manera inhibitoria o excitadora. Alteraciones en las concentraciones extracelulares de NT's pueden producir patologías como la epilepsia (Crouch, 1983; Kandel, 2001). Las crisis epilépticas son el resultado de un desequilibrio entre la excitación producida por el Glutamato (Glu) y la inhibición producida por el ácido γ -aminobutírico (GABA) (Massieu y cols., 1995).

1.1. Epilepsia

La epilepsia es un síndrome de disfunción cerebral de carácter recurrente que afecta a personas de todas las edades. Una sola crisis no significa epilepsia (hasta un 10% de la población mundial sufre una convulsión a lo largo de su vida), cuando una persona sufre dos o más convulsiones dentro de los tres años de la crisis inicial, se considera que tiene epilepsia. Existen muchas causas que pueden producir epilepsia incluyendo tumores cerebrales, accidentes cerebro vasculares y daños cerebrales como consecuencia de enfermedades ó lesiones (Dichter, 1997; Engel, 1989; Temkin, 2001). Las crisis convulsivas se caracterizan por presentar movimientos anormales del cuerpo o de las extremidades; en las crisis no convulsivas existe una alteración parcial o total de la capacidad de respuesta del sujeto o pérdida del tono postural e incluyen las crisis de ausencia caracterizadas por presentar lapsos de inconsciencia (Engel y Schwartzkroin, 2006; ILAE, 1981).

La epilepsia 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 ó de larga distancia (Andersen y cols., 2007; Pella, 2006).

Aproximadamente 50 millones de personas a nivel mundial padecen de epilepsia (OMS, 2012). Para diagnosticar la epilepsia se requieren de varios estudios: un registro electroencefalográfico el cual detectará actividad epileptiforme caracterizada por un aumento en la frecuencia y amplitud de la actividad eléctrica a nivel cerebral, una tomografía o resonancia magnética en la cabeza para encontrar la causa y localización del daño cerebral (Andersen y cols., 2007; Engel y Schwartzkroin, 2006; García-Pedroza, 1997; Pella, 2006).

Si bien la epilepsia es de origen multifactorial, los mecanismos neurales que la originan aún no se conocen con detalle, y todavía hay varios aspectos por estudiar y descubrir con respecto a su fisiopatología.

Aproximadamente el 60% de las epilepsias se desarrollan en el lóbulo temporal, en donde el hipocampo tiene un papel importante en el incremento de la actividad eléctrica debido a su arquitectura celular definida, gracias a su citoarquitectura podemos evidenciar la participación de varios sistemas de neurotransmisión (Glutamatergica y GABAérgica) durante las crisis epilépticas (Cabo de la Vega y cols., 2006).

1.1.1 Clasificación de las crisis epilépticas

La “*International League Against Epilepsy*” (ILAE) clasifica a las crisis epilépticas desde el punto de vista clínico en: parciales y generalizadas. Esta clasificación es de gran importancia para dar el tratamiento adecuado (Tabla 1) (Cabo de la Vega y cols., 2006; ILAE 1981).

Tabla 1. CLASIFICACIÓN DE LAS CRISIS EPILEPTICAS	
<i>“International League Against Epilepsy (ILAE) 1981”.</i>	
I. Crisis epilépticas parciales	<ul style="list-style-type: none"> a) Crisis parciales simples con signos motores, sensitivos, autónomos o psíquicos b) Crisis parciales complejas c) Crisis parciales con generalización secundaria
II. Crisis epilépticas primariamente generalizadas	<ul style="list-style-type: none"> a) Tónico – clónicas (gran mal) b) Tónicas c) Atónicas d) Mioclónicas
III. Crisis epilépticas no clasificadas	<ul style="list-style-type: none"> a) Crisis neonatales b) Espasmos infantiles

En la epilepsia parcial se presentan cambios anatómicos irreversibles al tener una pérdida neuronal en la capa de células piramidales de los subcampos hipocámpicos, en un periodo de semanas a meses. Éstas ocurren cuando la actividad eléctrica permanece en un área limitada (Acharya, 2002). Por otra parte, existen varios tipos de crisis generalizadas como las clónicas, de ausencia, mioclónica, atónicas y tónico-clónicas (Tabla 1), y éstas se caracterizan por actividad eléctrica anormal, la cual afectará a todo el cerebro (Williamson y cols., 1999).

1.2. Hipocampo

La formación hipocámpica es una parte filogenéticamente antigua de la corteza, que durante el desarrollo es desplazada desde la superficie al interior del cerebro. En los mamíferos como en los roedores y felinos, se curva debajo de la neocorteza del lóbulo temporal ó debajo de la neocorteza de los lóbulos occipital, parietal y temporal. En los primates toda la formación hipocámpica está restringida al lóbulo temporal (Squire, 2004).

La susceptibilidad del hipocampo para desarrollar epilepsia y presentar crisis se debe a su circuitería. Las células piramidales que conforman al hipocampo presentan receptores-canales que permanecen por más tiempo abiertos y por lo tanto el flujo de Ca^{++} se incrementa; esto facilita la permeabilidad a iones en los receptores a glutamato tipo AMPA y kainato (Cabo de la Vega y cols., 2006; Kardos, 1999).

El hipocampo tiene tres subdivisiones: CA3, CA2 y CA1, pero la formación hipocámpica completa con sus aferencias y eferencias incluyen al giro dentado (GD), subiculum (SB), presubiculum (Pre), parasubiculum (Para) y la corteza entorrinal (CE) cada uno de ellos con una compartimentalización laminar y con grupos neuronales en los que incluyen células piramidales y granulares excitadoras e interneuronas inhibitoras (Figura 1) (Witter y Amaral, 2004).

Aproximadamente el 80 – 90% de las sinapsis en el hipocampo son glutamatérgicas. El glutamato media principalmente las actividades relacionadas con la cognición, la formación de memoria incluyendo la recuperación de la memoria (Bliss y Collingridge, 1993; Fonnum, 1984; Nakanishi, 1992).

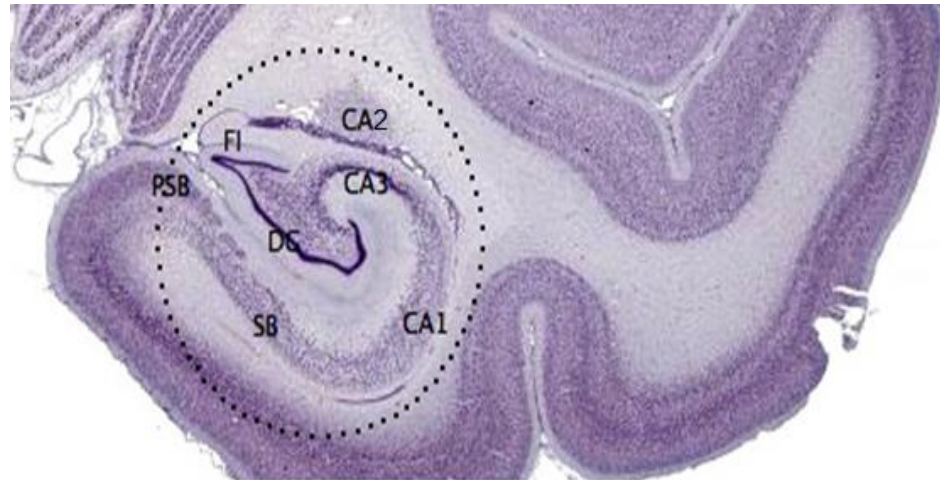


Figura 1. Imagen de una sección coronal obtenida mediante tinción de Nissl del cerebro de macaco. La zona más distal, designada CA1, se caracteriza por estar formada por células piramidales pequeñas, mientras la zona más proximal formada por el área CA2 y CA3, es rica en células piramidales de mayor tamaño. **(PSB)** presubiculum, **(FI)** Fimbria, **(DG)** giro dentado, **(SB)** subiculum, **(CA)** *Cornus Ammonis* (Witter y Amaral, 2004).

La formación hipocámpica contiene una gran cantidad de proyecciones ricas en glutamato, GABA, Acetilcolina (Ach), péptidos co-transmisores y otros neurotransmisores que van desde la CE a través de la vía perforante hacia el GD, los subcampo CA3-CA1 y SB (Figura 2) (Smolders y cols., 1997). Cada región posee un patrón único de aferencias y eferencias; así como, de grupos celulares definidos que forman el circuito trisináptico hipocámpico, el cual funciona de la siguiente manera: las células granulares del GD envían sus axones (fibras musgosas) a las células piramidales de CA3; éstas a su vez envían axones que proyectan hacia las células piramidales de CA1 (colaterales de Schaffer); las células piramidales de CA1 envían sus conexiones al SB, el cual proyecta hacia afuera de la formación hipocámpica. Existe una zona de transición que no recibe aferencias de las fibras musgosas y se define como CA2 (Witter y Amaral, 2004).

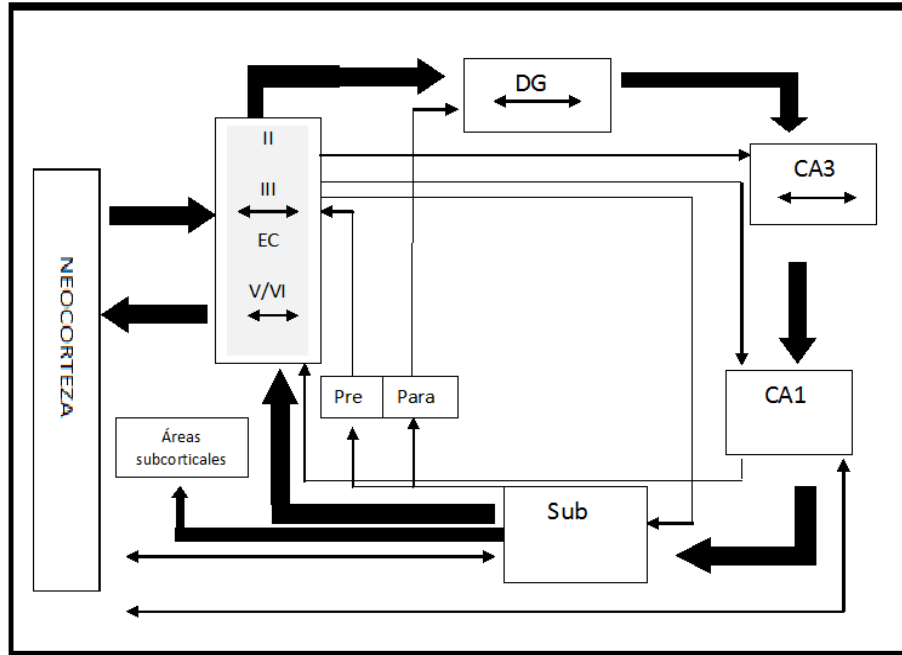


Figura 2. Vías del circuito trisináptico. A pesar de que el circuito en gran parte es unidireccional; este contiene proyecciones de asociación paralela y serial. Flechas gruesas indican la proyección principal del circuito; flechas delgadas indican proyección a otras áreas sin seguir la vía del circuito trisináptico. (**EC**) corteza entorrinal, (II, III, V y VI) capas de la corteza entorrinal, (**DG**) giro dentado, (**Sub**) subículo, (**Pre**) presubiculum, (**Para**) parasubiculum, (**CA**) *Cornus Ammonis* (Andersen y cols., 2007).

1.3. Corteza Entorrinal

Una de las estructuras con más importancia para el circuito hipocámpico es la CE; es el punto de inicio y punto final del proceso de información hipocámpica, que puede retornar a la neocorteza. Esta cuenta con una organización laminar bien diferenciada que toma como base la nomenclatura propuesta por Ramón y Cajal que considera cuatro capas celulares (II, III, V, VI) y dos capas acelulares plexiformes (I, IV) (Witter y Amaral, 2004). Los tipos celulares presentes en la CE se identificaron por Ramon y Cajal y varían según la lámina en que se encuentren: **a) lámina I**, está poblada por interneuronas GABAérgicas que inervan al GD, **b) lámina II** por neuronas

piramidales que proyectan al GD y CA3, **c) lámina III** posee células piramidales, **e) lámina V** contiene tres tipos de neuronas: las piramidales, células esféricas pequeñas y las fusiformes, **f) lámina VI** tiene gran variedad celular y se clasifica según la dirección o lugar de inervación, ya sea a otras capas, la misma CE, GD e hipocampo. Cabe mencionar que la CE posee interneuronas GABAérgicas presentes en todas las capas pero con mayor abundancia en zonas superficiales (Andersen y cols., 2007; Witter y Amaral, 2004).

Para comprender los mecanismos básicos de inducción de las crisis epilépticas se realizan estudios con diferentes técnicas en diversos modelos experimentales de epilepsia. Las principales regiones del cerebro en estos estudios son la neocorteza y el hipocampo. En particular para el hipocampo se han propuesto algunas hipótesis que involucran cambios anatómicos, celulares y sistemas de neurotransmisión como los responsables de la actividad epileptiforme (Mody y cols., 1987).

2. ANTECEDENTES

2.1 Neurotransmisión Glutamatérgica

Un neurotransmisor (NT) es una molécula que se sintetiza en la parte pre-sináptica de una neurona, se almacena en vesículas sinápticas y es liberado en la hendidura sináptica para producir cambios en el potencial de acción en la neurona post-sináptica y con ello realizar una comunicación ó señalización intracelular (Figura 3) (Siegel y cols., 2006).

El glutamato (Glu) es un aminoácido dicarboxílico no esencial, se sintetiza a partir de la glucosa y por diversas vías metabólicas. Las enzimas que sintetizan y metabolizan el Glu se localizan principalmente en dos compartimientos cerebrales, las neuronas y las células gliales. Intervienen cinco enzimas para el metabolismo de Glu: Glutamato deshidrogenasa (GDH), Aspartato amino-transferasa (AAT), Glutamina sintetasa (GS), Glutaminasa de fosfato activado (PAG) y Glutamato descarboxilasa (GAD) (Figura 4) (Schousboe y Waagepetersen, 2006).

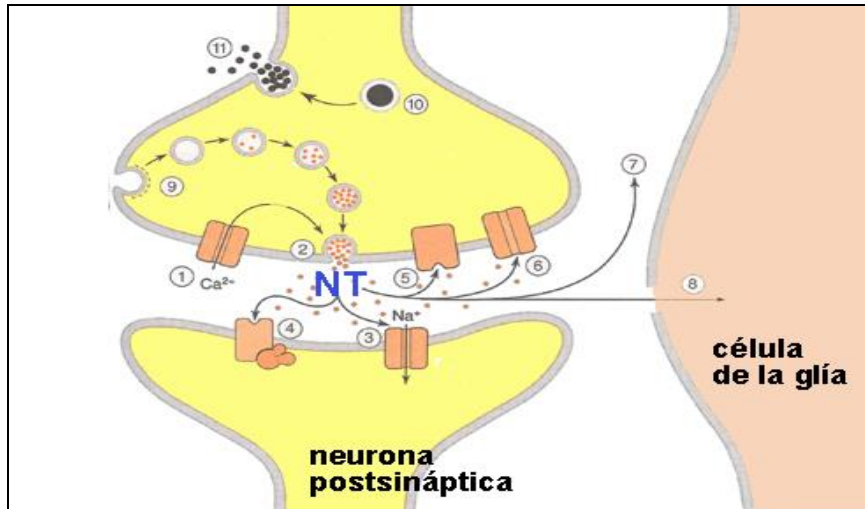


Figura 3. Sinapsis química. **1)** La entrada de Ca^{++} activa zonas de la membrana plasmática, **2)** Exocitosis a través de vesículas con contenido de NT's, **3)** NT actúa en receptores con canal iónico ó **4)** receptores acoplados a proteínas G, **5)** receptores en la terminal pre-sináptica que modulan el incremento ó la disminución de la liberación del NT, **6)** el NT se recaptura por proteínas de transporte acoplado a un gradiente de Na^+ , **7)** degradación del NT, **8)** recaptura y metabolismo del NT por células gliales, **9)** reciclaje de las vesículas vacías, **10)** algunos neuropéptidos se almacenan en la terminal pre-sináptica y **11)** se liberan a sitios distintos luego de estimulación continua (Siegel y cols., 2006).

Glu es el principal neurotransmisor (NT) excitador en el SNC de los mamíferos, está involucrado en diversos procesos fisiológicos como la coordinación motora y la cognición que incluye los procesos de memoria y aprendizaje (Balcar, 2002). Alteraciones en las concentraciones de Glu se han relacionado con diversas patologías neurológicas como la epilepsia (Bliss y Collingridge, 1993; Carlsson y Carlsson, 1990; Dávalos y cols., 2000; Fonnum, 1984; Maragakis y Rothstein, 2004; Morales-Villagrán y cols., 1996; Morales-Villagrán y cols., 2008; Nakanishi, 1992; Turski, 1993).

El Glu participa como un mediador de la información sensorial, coordinación motora, emociones y cognición en las que se incluyen la consolidación de la memoria (Siegel y cols., 2006).

El Glu en condiciones normales se encuentra en concentraciones elevadas en las terminales nerviosas y en bajas concentraciones en el espacio extracelular ($<1\mu\text{M}$) (Fonnum, 1984; Cotman y cols., 1987). La

concentración de Glu en las estructuras de la sustancia gris del cerebro varía entre 10 y 15 mM/g de tejido, más que en prácticamente otros tejidos del cuerpo. En la sustancia blanca la concentración de Glu es de 4–6 mM/g (BjØrny Raymond, 2006).

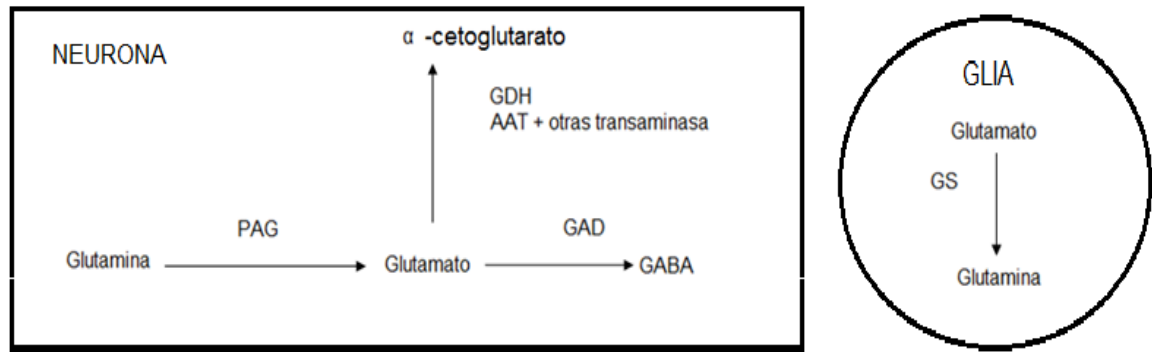


Figura 4. Vía metabólica de Glutamato. **GDH** (Glutamato deshidrogenasa), **AAT** (Aspartato amino-transferasa), **GS** (Glutamina sintetasa), **PAG** (Glutaminasa de fosfato activado) y **GAD** (Glutamato descarboxilasa) (Schoousboe y Waagepetersen, 2006).

La mayoría de las células cerebrales contienen Glu y se puede encontrar tanto en el citosol como en la mitocondria y de manera regular en las vesícula sinápticas (Siegel y cols., 2006). El Glu se sintetiza en terminales pre-sinápticas a partir de glutamina por acción de la glutaminasa y del 2-oxoglutarato por acción de la Glu deshidrogenasa. Se almacena en las vesículas por un sistema de transporte altamente específico que depende de Mg^{++} y del gradiente protónico, se libera en la hendidura sináptica por fusión de las vesículas a la membrana plasmática dependiendo de Ca^{++} , después de liberarse se une a receptores ionotrópicos ó metabotrópicos que ejercen efectos excitadores. Posteriormente a su unión con receptores se retira de la hendidura sináptica, mediante sistemas de transporte presentes en la glía y neuronas. El Glu que se captura por la glía y se convierte en glutamina gracias a la glutamina sintetasa y se difunde a través del espacio extracelular

de regreso a las neuronas. El Glu es responsable de los potenciales post-sinápticos de excitación rápida en muchas de las sinápsis cerebrales y cambios en la despolarización paraxónica (Figura 5) (Meldrum, 2000).

2.1.1 Receptores para glutamato

Los receptores a Glu se clasifican en dos categorías: ionotrópicos y metabotrópicos (Tabla 2).

Los receptores ionotrópicos con una estructura en forma de canal que se abren al unirse el Glu a su sitio de anclaje. Se subdividen en N-metil D-Aspartato (NMDA), α -amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxasol-propionico (AMPA) y Kainato; estos constan de ensamblajes heteroméricos de cuatro subunidades codificadas por genes específicos para cada subunidad, estos canales conducen iones como Na^+ , Ca^{++} y Cl^- , (Andersen y cols., 2007).

Los receptores metabotrópicos asociados o activados por proteínas G sin formar canal (Siegel y cols., 2006) se dividen en ocho subtipos diferentes que van desde mGlu1 hasta mGlu8 y se subclasifican en tres tipos según su secuencia de homología, perfil farmacológico y acoplamiento a su vía de traducción intracelular; en el grupo I se encuentran mGlu1 y mGlu5, en el grupo II están mGlu2 y mGlu3 y en el grupo III encontramos a mGlu4, mGlu7 y mGlu8 (Lujan y cols., 2005).

Tabla 2. Clasificación de los receptores de Glutamato (Andersen y cols., 2007).

Ionotrópicos				
non-NMDA		NMDA	Metabotrópicos	
AMPA	kainato			
GluR1	GluR5	NMDAR1	mGluR1	mGluR4
GluR2	GluR6	NMDAR2A	mGluR2	mGluR5
GluR3	GluR7	NMDAR2B	mGluR3	mGluR7
GluR4	KA1	NMDAR2C	mGluR6	mGluR8
	KA2	NMDAR2D		
		NMDAR3		

En modelos experimentales animales al sobreactivar los receptores NMDA (Smolders y cols., 1997) y receptores metabotrópicos de Glu ocasionan una transmisión excitadora exacerbada que puede ser debida a deficiencias en la recaptura de Glu, esta deficiencia provoca que el NT escape de la hendidura sináptica y active otros receptores metabotrópicos presentes en terminales GABAérgicas, que posiblemente dará como resultado una deficiencia en el control de la inhibición por parte de la interneurona (Andersen y cols., 2007).

2.1.2 Transportadores de Glutamato

Los transportadores de glutamato son proteínas fundamentales para regular los niveles del neurotransmisor en la hendidura sináptica y para el buen funcionamiento de las sinapsis químicas del SNC. Alguna alteración en la estructura ya sea en la dependencia iónica o propiedad del canal compuerta-ligando Cl⁻ del propio transportador por agentes internos ó externos podría desencadenar su mal funcionamiento y favorecer el desarrollo de diversas enfermedades neurológicas, como la epilepsia. Estudios detallados de la estructura, función y participación de los transportadores de Glu en algunas enfermedades neurológicas podrían ayudar en el futuro a encontrar nuevas

alternativas terapéuticas a estas afecciones neurológicas (Medina-Ceja y cols., 2008).

Hasta hoy se han identificado cinco transportadores de Glu denominados GLAST (EAAT1) y GLT-1 (EAAT2); estos transportadores están presentes principalmente en los astrocitos, aunque también se han observado en las neuronas. EAAC1 (EAAT3) se encuentra en las neuronas, EAAT4 está presente en las dendritas de células de Purkinje en el cerebelo, y EAAT5 se encuentra en la retina (Figura 5) (Arriza y cols., 1994; Arriza y cols., 1997; Fairman y cols., 1995; Kanai y Hediger, 1992; Pines y cols., 1992).

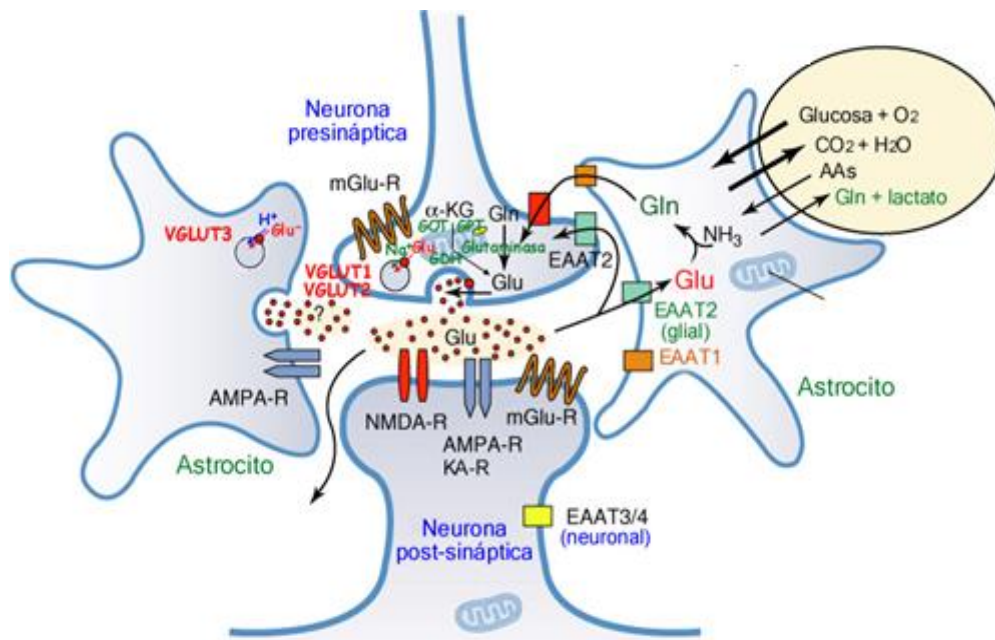


Figura 5. Sinapsis glutamatérgicas. Un estímulo nervioso provoca la liberación de Glu almacenado en la vesícula sináptica al espacio extracelular. El Glu liberado actúa sobre sus receptores ionotrópicos y metabotrópicos produciendo la excitación de la neurona post-sináptica. Después de su acción sináptica el Glu es capturado por transportadores localizados en las neuronas y los astrocitos, finalizando así la actividad de la sinapsis excitadora y manteniendo bajas las concentraciones extracelulares de Glu. (**Glu**) Glutamato, (**EAAT**) Transportadores de aminoácidos excitadores (**Gln**) Glutamina, (**mGlu-R**) receptores metabotrópicos de Glu (**VGLUT**) transportadores vesiculares de Glu, (**NMDA-R**, **AMPA-R** y **KA-R (Kainato)**) Receptores ionotrópicos de Glu, (**GDH**) Glutamato deshidrogenasa y (**α-KG**) α-cetoglutarato (Bjørnary Raymond, 2006).

2.1.3 Papel del Glutamato en la epilepsia

Concentraciones altas de Glu en el espacio extracelular son neurotóxicas. Los incrementos de Glu al momento de las crisis epilépticas han sido mostrados en estudios experimentales que utilizan técnicas de microdiálisis y biosensores electroquímicos, mostrando al Glu como el factor de inicio de las descargas epileptiformes y propagación de las crisis en el hipocampo y la CE debido a cambios en la concentración del NT (Morales-Villagrán y cols., 2008).

La liberación excesiva de Glu y sobre todo la estimulación de sus receptores se han asociado con varias alteraciones neurológicas que incluyen la esquizofrenia, la enfermedad de Parkinson y la epilepsia (Carlsson y Carlsson, 1990; Dávalos y cols., 2000; Morales-Villagrán y cols., 1996; Morales-Villagrán y cols., 2008; Turski, 1993). Investigaciones muestran que el Glu es un factor importante en el desarrollo e iniciación de las crisis epilépticas (Medina-Ceja y cols., 2000; Peña y Tapia, 1999; Tapia y cols., 1999).

2.2 Modelos experimentales para el estudio de la epilepsia

Se han desarrollado modelos experimentales para facilitar la investigación de la epilepsia, los cuales se basan principalmente en mimetizar las crisis epilépticas observadas en el humano. Existen diferentes maneras de inducir epilepsia en los modelos experimentales: por estímulos químicos y estímulos físicos (Engel y Schwartzkroin, 2006; Fisher, 1989).

Los electrochoques son uno de los modelos por estímulos físicos más utilizados, consiste en la aplicación de corrientes eléctricas por medio de electrodos en regiones cerebrales y permite la apertura de canales dependientes de voltaje produciendo una mayor actividad neural y crisis

convulsivas. La estimulación eléctrica se realiza con diferentes voltajes dependiendo la finalidad del investigador ó para tratamientos en pacientes con patologías neurológicas (Zavala-Tecuapetla y López-Meráz, 2013).

Un modelo experimental por estímulos químicos es el DL-threo-beta-benziloxiaspartato (TBOA) el cual es un fármaco derivado de DL-threo-beta-hidroxiaspartato (THA) que inhibe los transportadores de Glu/Aspartato dependientes de sodio, el fármaco disminuye la captación del NT incrementando la concentración extracelular de Glu, aumentando la neurotoxicidad (Montiel y cols., 2005). No muestra actividad en los receptores metabotrópicos (mGlu1, mGlu2, mGlu4). Por lo tanto, el TBOA es altamente selectivo para EAAT por sus siglas en ingles *Excitatory Amino Acid Transporter* (EAAT1, EAAT2 y EAAT3) frente a los receptores de Glu (Shimamoto y cols., 1991).

El efecto tóxico depende de la dosis de aplicación del fármaco y se ha observado que en el hipocampo y el cuerpo estriado de la rata, aumenta las concentraciones de Glu y Aspartato notablemente y con ello la muerte neuronal en la región CA1 (Montiel y cols., 2005).

2.3 Técnicas para medir neurotransmisores

La cuantificación de los neurotransmisores se lleva a cabo por diversas metodologías, con la finalidad de conocer lo que sucede en desordenes neuronales como la epilepsia, se ha utilizado principalmente la técnica de cromatografía líquida y procesos enzimáticos, los cuales permiten cuantificar NT's a partir de la colecta del NT por microdiálisis.

La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la colecta por microdiálisis (MD) es una técnica para cuantificar las concentraciones de las moléculas biológicas y otras sustancias tanto *in vivo* como *in vitro* (Figura 6) (Bourne, 2003). La microdiálisis cerebral (MDC) es un método que utiliza un sistema cerrado, en el cual un tubo fino con una membrana de diálisis en uno de sus extremos se inserta en una región determinada del encéfalo, produciéndose una transferencia pasiva de sustancias que cruzan la membrana de diálisis en virtud de un gradiente de concentración establecido entre un líquido de perfusión y el medio extracelular. Esta técnica permite estimar con exactitud la liberación de NT's, sus metabolitos y estudiar los cambios inducidos en ellos por drogas, que pueden perfundirse a través de la sonda de diálisis o ser administradas por vía sistémica, todo ello encontrándose el animal en libre movimiento (Ault y cols., 1994; Bito y cols., 1966; Revuelto-Rey y cols., 2012).

El desarrollo de microcolumnas para cromatografía ha hecho posible la separación de ciertos NT's en volúmenes mínimos de fluidos biológicos, particularmente en el caso de las monoaminas, ya que por las dimensiones de estas columnas y el alto grado de eficiencia de separación, se ha logrado alcanzar un nivel de sensibilidad molar, suficiente para determinar la concentración de estos compuestos mediante detección electroquímica en una sola célula (Cooper y cols., 1992).

En la mayoría de las investigaciones, la técnica de cuantificación empleada es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por sus siglas en inglés "*High Performance Liquid Chromatography*", esta puede ser automática y en unos minutos obtener resultados, determinando la concentración de los compuestos mediante detección electroquímica (Cooper y cols., 1992).

Con esta herramienta, se ha logrado medir una variedad de neurotransmisores, entre los que destacan la serotonina, las catecolaminas, y al menos cinco aminoácidos diferentes (Gilman y Ewing, 1995; Lillard y cols., 1996; Parrot y cols., 2004; Parpura y cols., 1998).

Tanto las técnicas de microdiálisis como las de cromatografía restringen la dinámica experimental (Sim y cols., 2006) y la limitante de velocidad de muestreo (entre 3 y 10 minutos), la precisión de la detección del volumen muerto, que indica la diferencia entre el tiempo en el que ocurren las alteraciones bioquímicas en la sonda insertada en el cerebro y el tiempo que tardan las moléculas en llegar al lugar donde se colecta la muestra para lograr la correlación de eventos neuroquímicos con la actividad electroencefalográfica (Wilson y cols., 1996). Para un estudio eficiente de los eventos neuroquímicos rápidos se requiere una técnica que facilite la cuantificación en una escala de segundos.

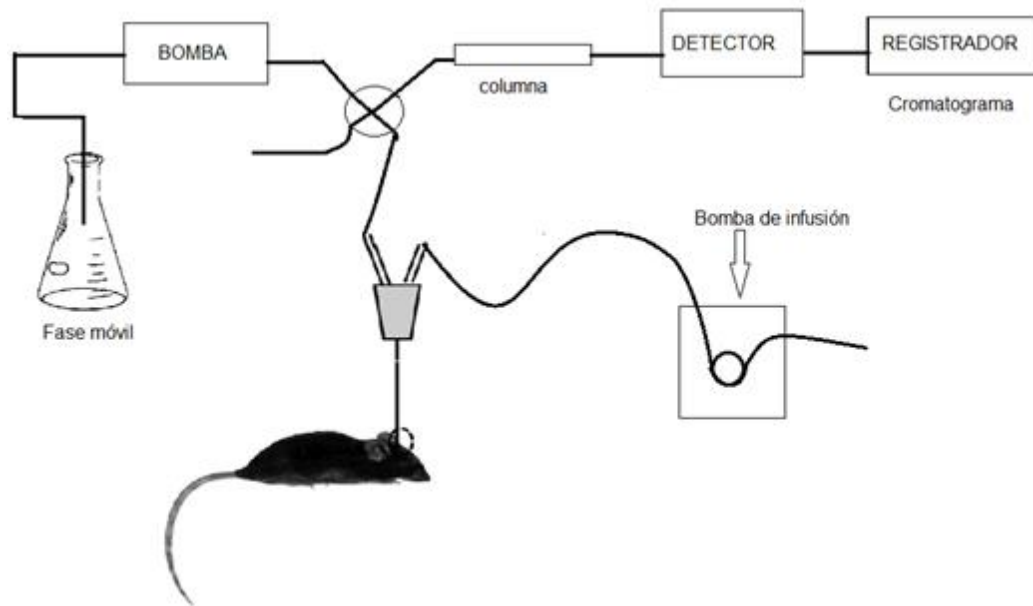


Figura 6. Esquema general del sistema de microdiálisis y del sistema de detección por HPLC (Ault y cols., 1994).

2.3.1 Técnica enzimática

Esta técnica nos permite tener una especificidad que es proporcionada por acción enzimática, la cual actúa sobre el NT de interés, así como el alto rango de sensibilidad y una cuantificación rápida. Morales-Villagrán y colaboradores (2008) por medio de una detección electroquímica, identificaron NT's excitadores (Glu y Ach) utilizando enzimas fijadas en biosensores que posteriormente se insertaban en el cerebro de la rata que se encontraba en libre movimiento. Para lograr la degradación del neurotransmisor y generar un agente que proporcione fluorescencia, es necesaria la implementación de un reactor enzimático.

2.3.1.1 Amplex Red

El kit de Amplex Red para la medición de Ácido Glutámico/Glutamato Oxidasa proporciona un método ultrasensible para la detección continua de Glu ó para monitorear la actividad oxidasa en un lector de microplacas de fluorescencia o fluorómetro. En el ensayo, el ácido L-glutámico se oxida por la glutamato oxidasa (GluOx) para producir α -cetoglutarato, NH_3 y H_2O_2 . Las enzimas L-alanina transaminasa y L-glutamato-piruvato se incluyen en la reacción para regenerar el ácido L-glutámico por transaminación del α -cetoglutarato, lo que resulta en múltiples ciclos de la reacción inicial y una amplificación significativa del H_2O_2 producido. El peróxido de hidrógeno reacciona con el 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (Amplex Red) en una relación estequiométrica 1:1 la reacción catalizada por la peroxidasa de rábano (HRP) genera el producto altamente fluorescente, resorufina (Mohanty y cols., 1997; Wakayama y cols., 1997).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Glu es el neurotransmisor excitador por excelencia en el SNC de los mamíferos y juega un papel muy importante en diversos procesos fisiológicos del sistema nervioso como el desarrollo de la plasticidad, la memoria y el aprendizaje. La liberación excesiva de Glu ha sido asociada con epilepsia y convulsiones, por lo que es importante monitorear los cambios de las concentraciones extracelulares cerebrales de Glu, en condiciones normales y patológicas, en tiempo real. Algunos estudios de microdiálisis asociados con cromatografía han demostrado un aumento en los niveles de Glu durante las convulsiones tanto en humanos como en diferentes modelos de epilepsia, sin embargo, con la técnica de cromatografía resulta difícil correlacionar la actividad eléctrica con la actividad bioquímica del cerebro, aunque la actividad electrofisiológica se pueden medir con un alto grado de resolución temporal y en tiempo real, los eventos bioquímicos aún no se han logrado determinar con tal resolución. Por lo tanto, es necesario obtener resultados con una resolución temporal en milisegundos de los eventos bioquímicos para poder asociarlos con una actividad eléctrica y así tener datos más reales de las concentraciones de Glu durante crisis convulsivas.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido al papel que desempeña el Glu en el desarrollo de la epilepsia, es importante conocer en que concentraciones se libera éste NT durante la actividad cerebral normal ó durante una alteración patológica, tal como la actividad epileptiforme. Una de las metodologías más utilizadas para la cuantificación de dicho NT es la técnica de microdiálisis acoplada a los sistemas de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica y fluorescente. Sin embargo, ésta técnica suele ser muy costosa además de necesitar volúmenes grandes de muestra para analizar la molécula de interés, y las colectas se realizan en minutos. Por lo que, es importante contar con una metodología que permita cuantificar Glu en tiempo real, además permite acoplar un registro electroencefalográfico y de menor costo.

5. HIPÓTESIS

La cuantificación de Glu en tiempo real mediante reacciones enzimáticas proporcionará información de las alteraciones en las concentraciones extracelulares de Glu obtenido del dializado de hipocampo en ratas macho adultas con estimulación eléctrica y administración de TBOA.

6. OBJETIVOS

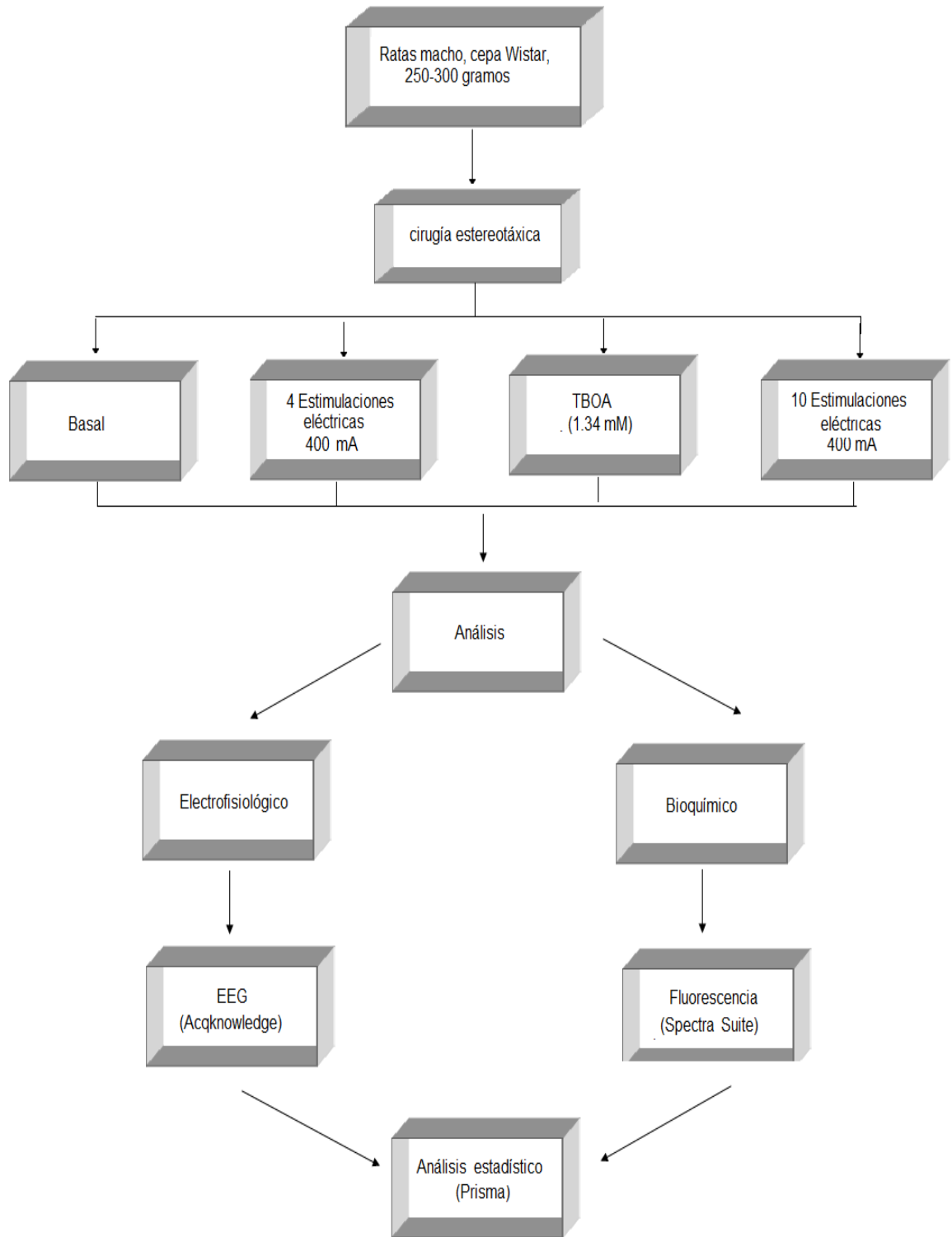
6.1. General

Evaluar las concentraciones extracelulares de Glu en tiempo real durante administración de estimulación eléctrica y TBOA, mediante el uso de un reactor enzimático específico para Glu.

6.2. Específicos

- Determinar la concentración extracelular de Glu en ratas con la aplicación del fármaco TBOA.
- Determinar la concentración extracelular de Glu en ratas con estimulación eléctrica.
- Correlacionar la actividad electroencefalográfica de animales con TBOA o estimulación eléctrica con la concentración de Glu.

7. DIAGRAMA EXPERIMENTAL



8. MATERIALES Y METODOS

8.1 Animales

Se utilizaron 7 ratas macho de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*), de 3 meses con un peso de 250-300 gramos, se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), humedad relativa del 21% y mantenidas con ciclos de luz/obscuridad 12:12 horas, alimentadas con una dieta balanceada para roedores y con libre acceso al agua. Todos los experimentos se realizaron con el mayor cuidado para evitar el sufrimiento de los animales, bajo la ley general de salud del reglamento interior de la comisión interinstitucional de investigación en salud, 2002, México, DF.

8.2 Cirugía estereotáxica

Los animales se anestesiaron con una mezcla de isoflurano en O_2 ; y se sujetaron en un marco estereotáxico con la barra de incisivos posicionada a -3.3 mm. Se fijó una cánula guía para la membrana de microdialisis (CMA3) de 3 mm (CMA Microdialysis AB) en el hipocampo en la región CA3 de acuerdo a las coordenadas en mm: -4.80 Antero Posterior (AP), -5.2 Lateral (L) y -5.0 Ventral (V) de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1997). Se implantaron 4 electrodos superficiales en corteza frontal izquierda y derecha. Dos electrodos de tungsteno se utilizaron para la estimulación eléctrica (frecuencia 100 Hz, duración 2.5 ms y retardo de 1.0 ms) y se implantaron en Corteza Entorrinal (CE) de acuerdo a las coordenadas en mm: -5.2 Antero Posterior (AP), -7 Lateral (L) y - 2.5 Ventral (V). Se soldaron todos los electrodos a un conector para obtener el registro electroencefalográfico (EEG). Todos los elementos utilizados en la cirugía se fijaron con acrílico dental, el cual se adhiere y seca con facilidad al cráneo de la rata para tapar

todos los electrodos (Figura 7). Una vez terminada la cirugía, se retiró la anestesia. La rata permaneció en observación durante 2 días para su recuperación total de la cirugía. Pasado este lapso de tiempo, se conectó una manguera a la entrada de la sonda de microdialisis y se conectó el otro extremo a una jeringa de vidrio de 1 ml colocada en una bomba de infusión electrónica digital Model: Fusion 200 (Chemyx Inc) la cual tenía un flujo de 2.5 $\mu\text{l}/\text{min}$. En la salida de la sonda de microdialisis se colocó una manguera, la cual permaneció conectada a otra bomba electrónica disminuyendo la presión en el sistema (*push-pull* microdialisis) y se dejó durante dos horas en recuperación.

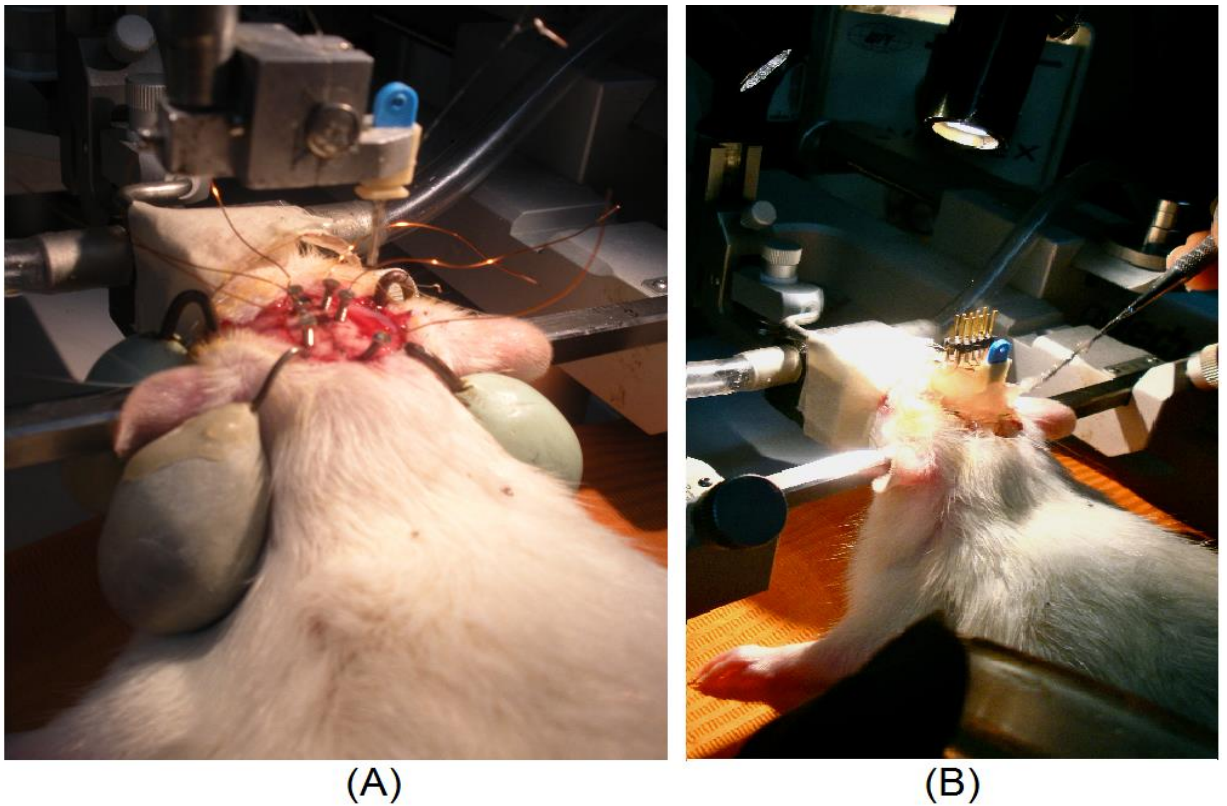


Figura 7. Cirugía estereotáxica. **(A)** Implantación de electrodos según las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson. **(B)** Pines para el registro EEG y cánula guía para microdialisis.

8.3 Preparación del reactor enzimático, calibración y cuantificación de Glu

Para determinar la concentración de las muestras obtenidas se utilizó un reactor específico para Glu. El reactor enzimático es específico para la medición de Glu por fluorescencia. Los componentes son los que aparecen en el Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones del reactor enzimático.

Peroxidasa de rábano (HRP)	1 U/ml
Glutamato oxidasa (GluOx)	0.5 U/ml
Amplex Red	200 μ M
L-Glutamato piruvato transaminasa (GPT)	0.25 U/ml
L- Alanina	200 μ M
Amortiguador de fosfatos de Na pH 7.4	100 mM

El reactor enzimático se preparó cada vez que se cuantificó. Para determinar la efectividad y sensibilidad del método, se realizaron curvas de calibración con diferentes concentraciones de Glu (50, 100, 200 y 500 μ M) las cuales fueron cuantificadas por fluorescencia.

La reacción enzimática se llevó a cabo dentro de una fibra hueca, la cual se encuentra adherida a una placa reguladora de temperatura, con una temperatura controlada de 38°C para permitir el desarrollo de la reacción, la solución que fluye tanto del dializado y el reactor enzimático se hace pasar a través de una celda de fluorescencia en donde se encuentra una fibra óptica que conduce el haz de excitación de manera continua, el haz de luz se genera con un módulo laser y se lleva a la celda de fluorescencia a través de una fibra óptica, perpendicular a esta se posiciona una segunda fibra que recogerá la luz emitida después de la excitación (emisión a 590 nm). Para la medición de la fluorescencia fue necesario un detector CCD (canal de carga acoplado) USB 4000 (*OceanOptics*).

8.4 Determinación del volumen muerto

Para realizar la correlación de las concentraciones de Glu y la actividad EEG es necesario calcular el tiempo en que tarda en pasar la solución de la recuperación de la membrana a través del dispositivo y hasta que llega a la celda de fluorescencia. El cálculo del tiempo muerto fue efectuado de manera empírica y a la velocidad de flujo con el cual se realiza todo el proceso experimental.

8.5 Análisis bioquímico y registro EEG

El procedimiento se dividió en cuatro fases y en todas las fases se realizó el registro EEG y de fluorescencia.

- 1. Registro del periodo basal:** Se cuantificó durante 20 min, esto con la finalidad de obtener un valor de referencia.
- 2. Aplicación de estimulaciones eléctricas:** Se aplicaron 5 descargas eléctricas comenzando con 400 microamperios de corriente y se incrementó dependiendo de la resistencia del sujeto experimental con el estimulador S88X GRASS (Astro-Med, Inc), la duración de cada estímulo fue de 2 segundos en intervalos de 5 min cada uno, con un retardo de 0.001 seg, el pulso fue monofásico con una duración de 0.0025 seg y una frecuencia de 200 Hz.
- 3. Aplicación del fármaco TBOA:** Posterior a la aplicación de estímulos eléctricos y 10 min de recuperación de la rata, se administró el fármaco TBOA 1.34 mM con un flujo de 0.0025 ml/min durante 10 min.
- 4. Aplicación de estimulaciones eléctricas:** Se aplicaron 10 descargas eléctricas de igual manera que las aplicadas antes del fármaco.

Los registros EEG se llevaron a cabo con un polígrafo marca Grass J79, registrando cuatro canales con una ventana de filtros de 0.1 Hz en baja y a 3.0 Hz en alta frecuencia, respectivamente. Los datos se capturaron en una computadora (I Mac) con el sistema de análisis MP150 y en el Software *Acqknowledge*. Los parámetros evaluados fueron frecuencia y amplitud de las descargas epileptiformes.

8.6 Análisis estadístico

Los datos se muestran como la media, desviación estándar y error estándar. Las diferencias estadísticas entre las medias se obtuvieron por ANOVA de una vía para diseños de grupos relacionados y la prueba de Dunnet, a través del programa de cómputo *GraphPadPrism*. Se consideraron significativas las diferencias con una $p < 0.05$.

9. RESULTADOS

En el presente trabajo se realizó la cuantificación del neurotransmisor Glu cercana al tiempo real con una resolución temporal de 200 milisegundos durante la actividad epileptiforme producida por la aplicación de estimulaciones eléctricas en CE y la aplicación del fármaco TBOA 1.34 mM en el hipocampo de rata macho adulta. No se agregó un grupo control, debido a que se determinó la concentración basal del Glu durante los primeros 20 minutos y con una recuperación del animal de al menos cuatro horas, debido a que el daño producido por la cánula guía y la colocación del conector al polígrafo incrementa los niveles de la concentración del NT.

9.1 Cambios en la concentración de Glu y correlación de la actividad EEG

La cuantificación de Glu con el software de *Spectra Suite* fue por medio de unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). El cálculo de las concentraciones se realizó con la comparación de las curvas de calibración que se hicieron media hora antes de cada experimento (Figura 8). La cuantificación de las concentraciones de Glu se reporta en unidades micromolares (μM).

Se realizó el registro durante 20 minutos para obtener el valor basal, posteriormente se aplicaron cinco estímulos eléctricos en la CE, y después se administró el fármaco TBOA durante 10 minutos en CA3 de hipocampo y finalmente se aplicaron diez estímulos eléctricos. En todos los experimentos se presentaron resultados similares, ya que se observó un aumento en las unidades de fluorescencia durante la aplicación de los diferentes tratamientos (Figura 9).

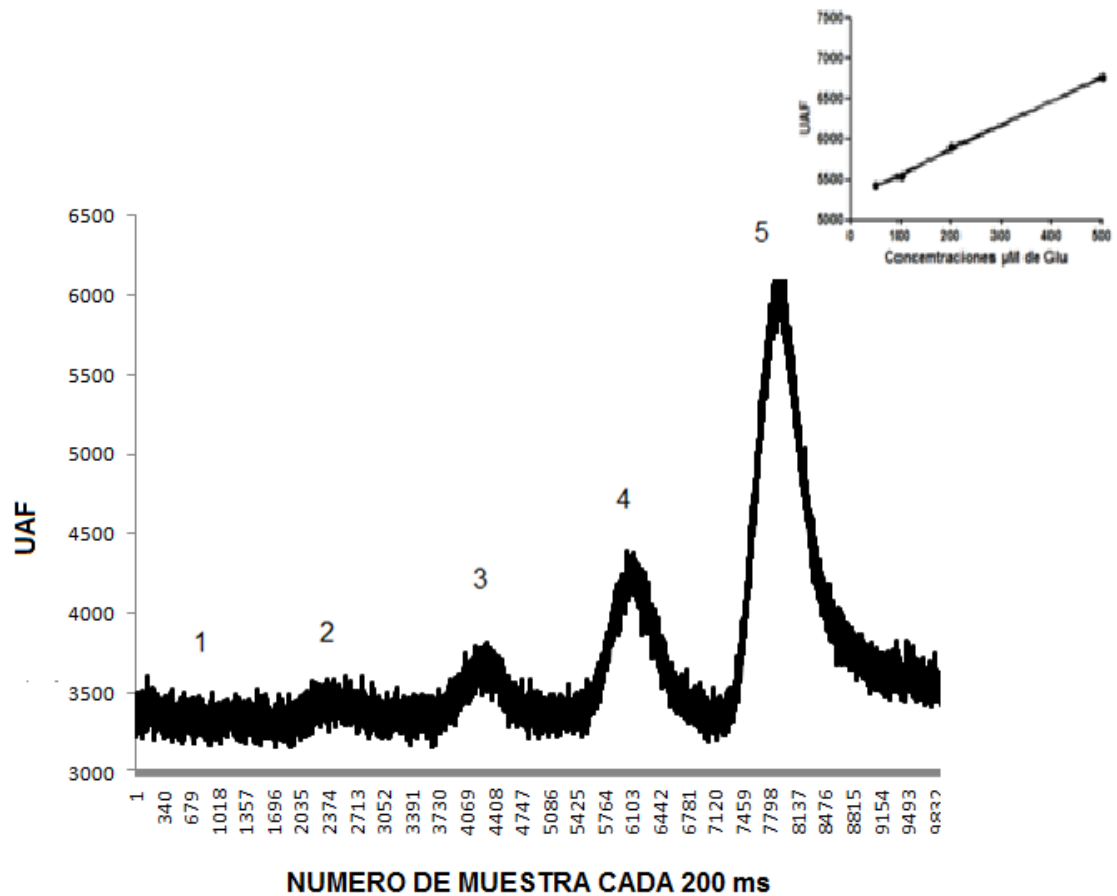


Figura 8. Curva de calibración de Glutámico. (1) Basal, (2) 50 μM, (3) 100 μM, (4) 200 μM, (5) 500 μM. En la esquina superior derecha se encuentra la gráfica de regresión lineal con una $r^2 = 0.9985$.

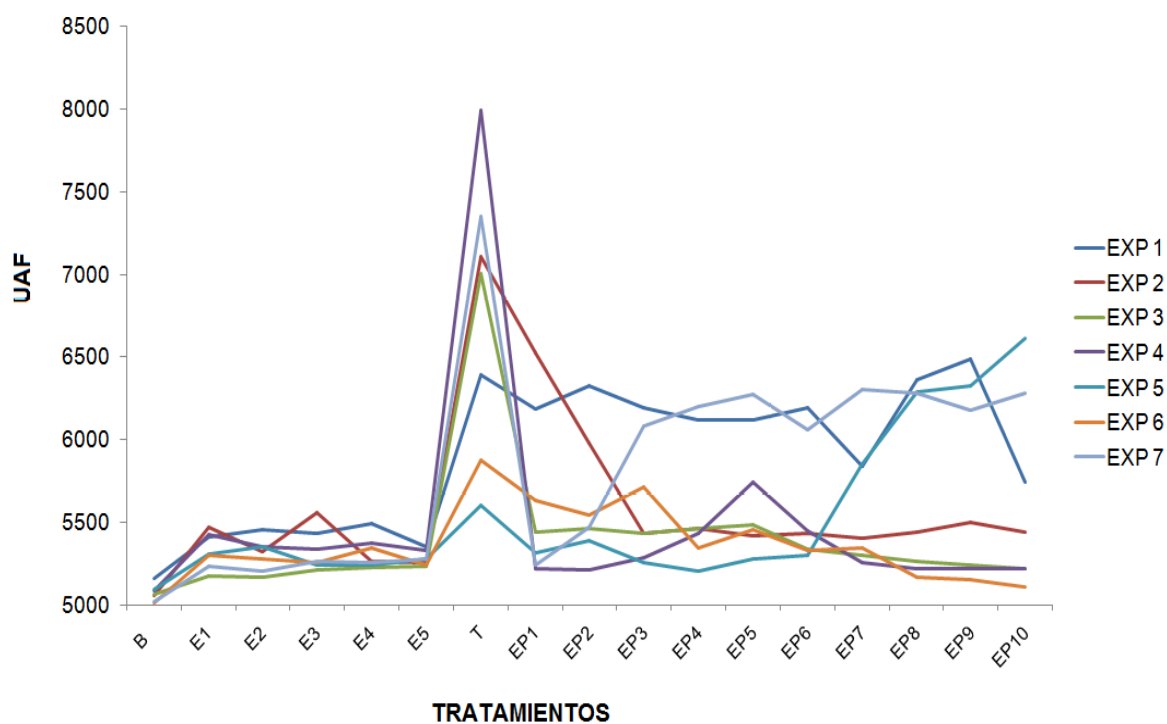


Figura 9. Curso temporal de la cuantificación de Glu en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) en los siete experimentos. **(B)** tiempo basal, **(T)** administración de TBOA en hipocampo, **(E)** primeras estimulaciones eléctricas en la CE, **(EP)** estimulaciones eléctricas posteriores al TBOA ($i = 400 \mu\text{A}$, $t = 2 \text{ seg}$).

Los estímulos eléctricos produjeron cambios no significativos en la concentración de Glu con respecto al valor de la basal ($2.23 \pm 0.18 \mu\text{M}$) mientras que la administración del inhibidor de los transportadores de Glu (TBOA) facilitó el incremento en la concentración extracelular del neurotransmisor Glu ($191.07 \pm 16.08 \mu\text{M}$), los estímulos eléctricos aplicados posteriores a la administración del fármaco mostraron un incremento significativo ($74.7 \pm 0.329 \mu\text{M}$) pero menor a los incrementos por la acción del fármaco (Figura 10).

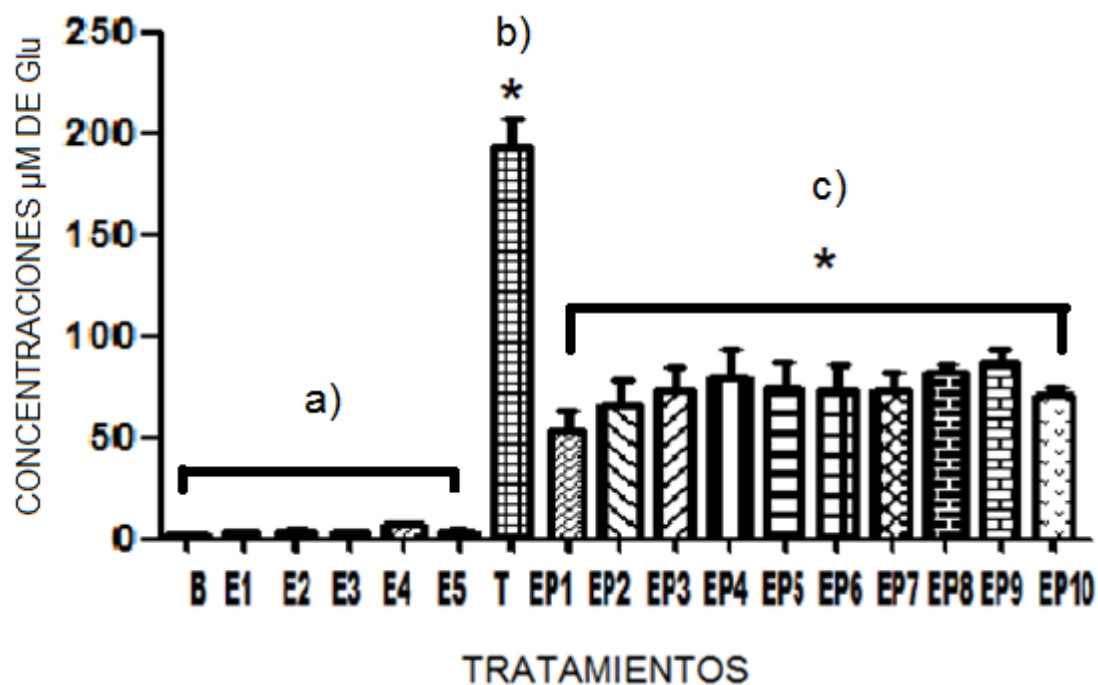


Figura 10. Experimento representativo de las concentraciones de Glu observadas en CA3 de Hipocampo. **B**, tiempo basal, **a)** estimulaciones anteriores al TBOA, **E1-E5**. **b)** incremento más significativo de Glu con la aplicación de TBOA (**T**), **c)** estimulaciones eléctricas posteriores al TBOA, **EP1-EP10**, * $p < 0.05$ ($i = 400 \mu\text{A}$, $t = 2$ seg).

La administración de TBOA 1.3 mM como la aplicación de los estímulos posteriores a su aplicación mostraron una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a la basal (Figura 11).

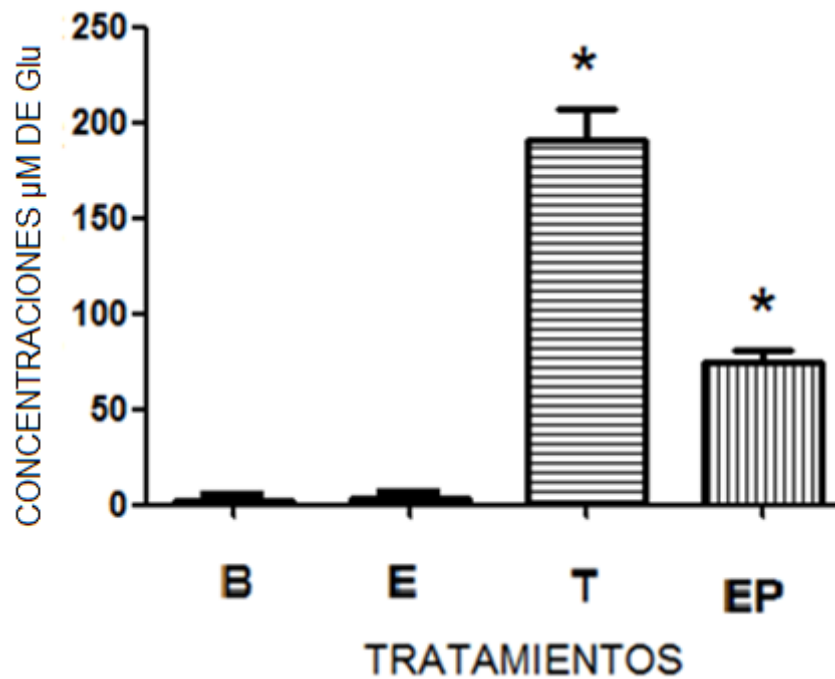


Figura 11. Promedio de las concentraciones mM de Glu observadas en CA3 de Hipocampo, (**B**) Basal, (**E**) estímulos eléctricos, (**T**) administración de TBOA y (**EP**) estímulos posteriores al fármaco ($i = 400 \mu\text{A}$, $t = 2 \text{ seg}$) ($n=7$).

La actividad eléctrica basal de los sujetos experimentales mostró una amplitud y frecuencia baja, mientras que al administrar el fármaco TBOA 1mM se presentó actividad de alta frecuencia y amplitud de la onda. En los animales estudiados se observaron descargas de amplitud y frecuencia alta, asociándose con los cambios en la concentración de Glu (Figura 12).

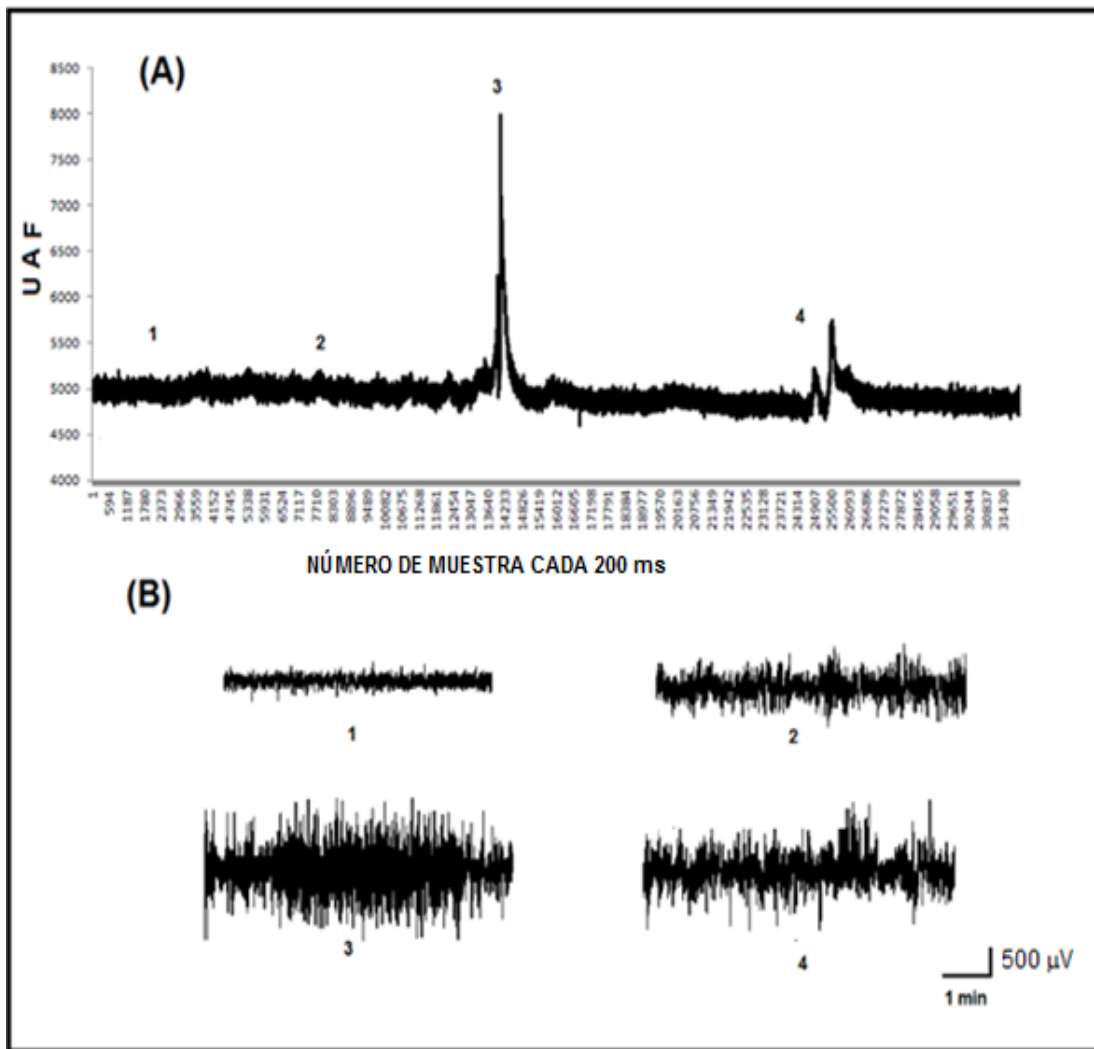


Figura 12. Experimento representativo del curso temporal de la concentración de Glu en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) y registro EEG en el hipocampo. En donde **1** representa la Basal, **2** estímulos eléctricos, **3** administración de TBOA y **4** los estímulos posteriores a la administración del fármaco ($i=400 \mu\text{A}$, $t=2 \text{ seg}$). **(A)** Unidades arbitrarias de fluorescencia de Glu cada 200 milisegundos. Los incrementos más significativos fueron durante la administración de TBOA y la aplicación de los estímulos posteriores a la administración del fármaco ($i=400 \mu\text{A}$, $t=2 \text{ seg}$). **(B)** Trazos del registro EEG en el hipocampo correspondientes a cada número señalado en la figura A. Durante la administración de TBOA y los estímulos posteriores al fármaco, se observaron descargas epileptiformes que corresponden a los incrementos de Glu observados en (A).

Los niveles máximos encontrados en la frecuencia de la actividad eléctrica registrados fueron: en CE (4.33 ± 0.54 Hz) e hipocampo (4.16 ± 0.41 Hz) durante la administración de TBOA (1.3 mM) y la aplicación de estímulos posteriores a la administración del fármaco con respecto a la basal ($1.5 \text{ Hz} \pm 0$) en CE (3.5 ± 0.35 Hz) e hipocampo (3.16 ± 0.198 Hz) (Figura 13).

Los niveles máximos encontrados en la amplitud de la actividad eléctrica fueron: durante la aplicación de TBOA (1.3 mM) en CE (1655.75 ± 175.42 μV) e hipocampo (2021.55 ± 150.15 μV) y los estímulos posteriores a la administración de fármaco con respecto a la basal (451.50 ± 2.234 μV) en hipocampo (1267.04 ± 84.2 μV) y CE (1161.74 ± 83.45 μV) (Figura 13).

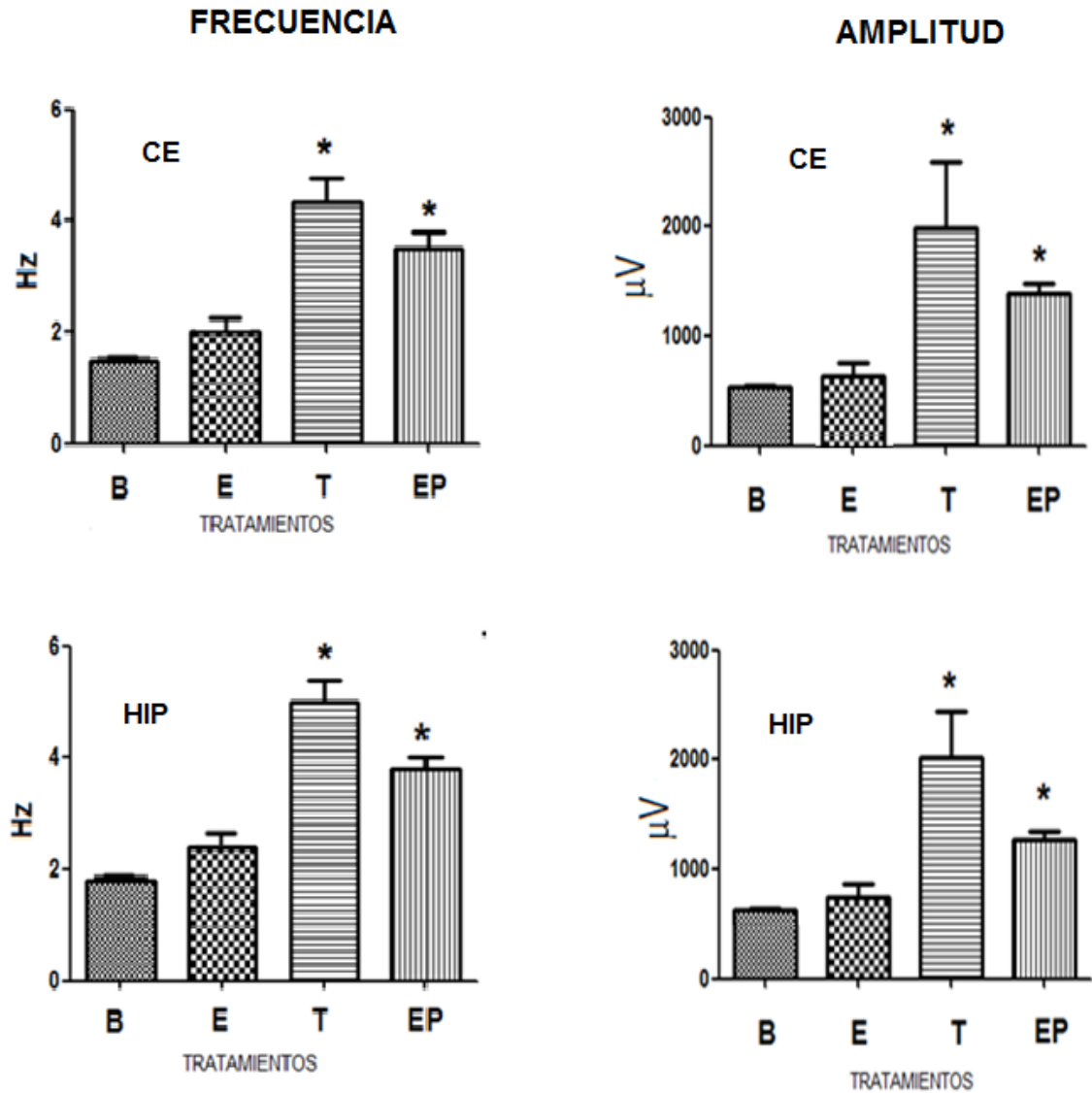


Figura 13. Frecuencia y amplitud registrada con los diferentes protocolos utilizados. $p < 0.05$ (*) (B) Basal (E) estímulos eléctricos, (T) TBOA y (EP) estímulos posteriores al fármaco (CE) cambios de frecuencia y amplitud en CE, (HIP) cambios en la frecuencia y amplitud de hipocampo.

Con estos resultados se demuestra que los incrementos en las concentraciones mM de Glu se pueden relacionar con la actividad eléctrica inducida por estimulación eléctrica y la administración del fármaco TBOA.

10. DISCUSIÓN

Para poder determinar y comprender las modificaciones bioquímicas o neuroquímicas que se presentan en las crisis epilépticas es necesario utilizar herramientas metodológicas que faciliten la cuantificación directa de los NT's en regiones específicas del cerebro, como el hipocampo, donde se pueda registrar los cambios en las concentraciones extracelulares del NT de interés (Glu) durante la actividad epileptiforme (During y Spencer, 1993; Medina-Ceja y cols., 2000; Morales-Villagrán y Tapia, 1996).

En el presente trabajo se determinó la concentración extracelular de Glu durante la actividad eléctrica producida tanto por la aplicación de estímulos eléctricos en la CE como por la administración de un inhibidor en la recaptura de Glu (TBOA), en hipocampo.

Trabajos previos demuestran que la microdiálisis *in vivo* es una herramienta eficiente y bien establecida para la cuantificación de NT's en regiones específicas del cerebro tanto en condiciones normales como patológicas (Ault y cols., 1994).

Los modelos de epilepsia agudos son de utilidad debido a que permiten examinar las patologías, en condiciones donde aún no existen modificaciones crónicas (Sierra-Paredes y cols., 2000). El acoplamiento de la técnica de microdiálisis con reactores enzimáticos nos permite manejar micro-volúmenes y nos muestra una alta resolución temporal debido a que no se requiere ninguna etapa de separación además de una alta especificidad y sensibilidad (Rhemrev-Boom y cols., 2001). Para tratar de comprender lo que sucede en un proceso epileptogénico, son necesarios los modelos experimentales de epilepsia, donde se modifique la función cerebral de los animales a través de la administración de drogas convulsionantes que produzcan actividad epileptiforme semejante a la epilepsia.

Morales-Villagrán y colaboradores (2008) muestran que la microdiálisis acoplada a reactores enzimáticos y correlacionados con registros EEG en ratas proveen datos *in vivo* con una alta resolución temporal de los cambios en las concentraciones de Glu mostrando la eficiencia de la técnica para la determinación de concentraciones extracelulares de Glu en una escala cercana al tiempo real.

Es importante mencionar que la penetración de la cánula y los electrodos de estimulación producen no solo un daño reversible al tejido sino también la despolarización local y liberación de NT's (Obrenovitch y cols., 1994), por ello los sujetos experimentales tuvieron un tiempo de recuperación que les permitiera estar en condiciones lo más estable posible.

La aplicación de fármacos, como la 4-aminopiridina (4-AP) producen cambios de manera inespecífica en la liberación y concentración de NT's (Morales-Villagrán y Tapia, 1996), así como actividad epileptiforme y daño neuronal (Mora y Tapia, 2005; Peña y Tapia, 2000; Tapia y cols., 1999). Morales-Villagrán y colaboradores (2008) cuantificaron Glu en ratas macho despiertas mediante el uso de un biosensor eletroquímico basado en la producción de H_2O_2 insertado en hipocampo y acoplado a un registro EEG, se administró 4-AP en CE para inducir convulsiones. Observaron una clara correlación entre la actividad EEG y alteraciones extracelulares de Glu en el inicio de la actividad epileptiforme en el hipocampo y en la terminación del experimento, cuando se sacrificaron los animales, sin embargo no se correlacionaron las concentraciones extracelulares de Glu con todos los cambios electrofisiológicos que podrían ser de interés para el mantenimiento de las convulsiones. En el presente trabajo se muestra un aumento en las concentraciones de Glu significativa ($p < 0.05$) con respecto al basal así como un aumento en la amplitud y frecuencia de la actividad eléctrica producida por la estimulación eléctrica.

Un estudio previo ha demostrado que la inhibición de los transportadores de Glu por el TBOA produce un efecto tóxico en el hipocampo y el cuerpo estriado de la rata, esto debido a los aumentos notables en la concentración de Glu además de muerte neural de CA1, sin embargo no se observaron cambios en el registro EEG (Montiel y cols., 2005), mientras que en el presente estudio se muestra que la administración de TBOA produce un incremento en la concentración extracelular de Glu (167.07 μ M), así como un aumento en la amplitud y frecuencia del registro EEG.

En el presente trabajo, los cambios observados en la actividad eléctrica debidos a la inhibición de los transportadores de Glu por la administración de TBOA, son el reflejo del aumento en la concentración extracelular de Glu y la estimulación eléctrica en CE lo cual produce actividad eléctrica de alta amplitud y frecuencia, estableciendo una correlación entre los cambios neuroquímicos y con la actividad eléctrica.

El incremento de las concentraciones extracelulares de Glu, el NT excitador por excelencia en mamíferos, está involucrado en las crisis epilépticas según lo demuestran varios trabajos (Medina-Ceja y cols., 2000; Scimemi y cols., 2006). La alta concentración de Glu potencializa la actividad sináptica e incrementa la amplitud de los potenciales post-sinápticos excitadores, su propagación a otras regiones puede producir descargas rítmicas con el consecuente incremento en la frecuencia. El fenómeno anteriormente mencionado lo observamos durante la administración de TBOA, que provocó el incremento en la concentración extracelular de Glu en el hipocampo, así como durante la aplicación de los estímulos posteriores a la administración del fármaco.

La determinación de la concentración extracelular de Glu con una técnica de alta resolución temporal y que permita el registro EEG facilita la comprensión de la participación de los sistemas de neurotransmisión durante la actividad eléctrica, lo cual permitirá ampliar el conocimiento sobre esta relación. La metodología que aquí se presenta, posee una alta resolución temporal, alta especificidad y contribuirá sin duda alguna a un mejor conocimiento de la neurotransmisión química durante la hiperexcitabilidad neuronal.

11. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede considerar que al menos en este trabajo donde se aplican estímulos eléctricos y la administración del inhibidor de los transportadores de Glu, el TBOA, se incrementó la concentración extracelular de Glu en el hipocampo (CA3) y puede relacionarse con un incremento en la amplitud y frecuencia de la actividad eléctrica.

El acoplamiento de la técnica de microdiálisis con el uso de un reactor enzimático permite cuantificar el NT de interés con una alta resolución temporal, sensibilidad y especificidad. La resolución temporal es de 200 milisegundos. El presente dispositivo de medición permite conocer mejor los cambios bioquímicos en relación a los eventos electrofisiológicos observados durante la aplicación de estímulos eléctricos o bioquímicos.

12. BIBLIOGRAFIA

Acharya NJ. 2002 Recent advances in epileptogenesis. *Current Sci.* 82: 679-688.

Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, 2007. *The hippocampus book*. Primera edición. Oxford University Press. pp. 770-777.

Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP, Amara SG. 1994. Functional comparison of three glutamate transporter sub- types cloned from human motor cortex. *J Neurosci.* 14: 5559-5569.

Ault JM, Riley CM, Meltzer NM y Lunte CE. 1994. Dermal microdialysis sampling *in vivo*: *Pharm Res.* 11:1631-1639.

BitoL, Davson H, Levin E, Murray M y Snider N. 1966. The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, *in vivo* dialysate of brain, and blood plasma of the dog. *J Neurochem.* 13: 1057-1067.

Bliss T y Collingridge G. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 361: 31-39.

Balcar VJ. 2002. Molecular pharmacology of the Na⁺- dependent transport of acid amino acids in the mammalian central nervous system. *Biol Pharm Bull.* 25: 291–301.

Bjørnar H. y Raymond D. 2006. *Glutamate Basic Neurochemistry Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Elsevier. Chap 15: 268-289

Bourne JA. 2003. Intracerebral microdialysis: 30 years as a tool for the neuroscientist. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 30: 16–24.

Cabo-de la Vega C, Villanueva-Hernández P y Prieto Martín A. 2006. The neurochemistry of epilepsy, inhibitory neurotransmission and experimental models: new perspectives. *Rev Neurol.* 42: 159-68.

Cotman CW, Monaghan DT, Ottersen OP, Storm. Mathisen J. 1987. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Cell Press.* 10: 273-280.

Carlsson M y Carlsson A. 1990. Schizophrenia: a subcortical neurotransmitter imbalance syndrome?. *Schizophrenia Bulletin.* 16:425-432.

Cooper BR, Jankowski JA, Leszczyszyn DJ, Wightman RM y Jorgenson JM. 1992. Quantitative determination of catecholamines in individual bovine adrenomedullary cells by reversed-phase microcolumn liquid chromatography with electrochemical detection. *Analchem.* 64: 691-694.

Crouch JE. 1983. *Anatomía Humana Funcional. Segunda Edición. Cecsca.* Cap 12: 319-336.

Dávalos A, Shuaib A y Wahlgren N. 2000. Neurotransmitters and pathophysiology of stroke: evidence for the release of glutamate and other transmitters/mediators in animals and humans. *J Stroke and Cerebrovascular Disease.* 9:2-8.

Dichter MA. 1997. Basic mechanisms of epilepsy : targets for therapeutic intervention. *Epilepsia. Engelborghs S., Pickut B. A.* 9: 2-6.

During MJ y Spencer DD. 1993. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet.* 341: 1607-1610.

Engel JJr. 1989. Seizures and Epilepsy. Philadelphia. Davis Company. 3:71-84.

Engel JJr y Schwartzkroin PA. 2006. What should be modeled? En: Pitkanen A, Schwartzkroin PA, Moshe SL (Ed.). Models of seizures and epilepsy. Elsevier.1-14.

Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG.1995. An excitatory amino acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel.Nature. 375: 599-603.

Fonnum F. 1984. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. J Neurochem. 42: 1-11.

García-Pedroza F. 1997. La epidemiología de neurocisticercosis en niños en México. En: San Esteban, JE., Flisser A., González Astiazarán A., eds. Neurocisticercosis infantil. México, Universidad Nacional Autónoma de México. Editorial Miguel Ángel Porrúa. pp. 19-38.

Gilman, SD y Ewing AG. 1995. Analysis of single cells by capillary electrophoresis with on-column derivatization and laser-induced fluorescence detection. Analchem. 67: 58-64.

Guzman P, Dantuono M y Avoli M. 2004. Initiation of electrographic seizures by neuronal networks in entorhinal cortex and perirhinal cortices *in vitro*. J Neurosci. 123: 875-886.

Kanai Y, Hediger MA. 1992. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. Nature. 360: 467-471.

Kandel ER., Schwartz JH y Jessell TM. 2001. Principios de Neurociencia. Mc Graw-Hill. Cuarta edición. Cap. 1: 1-17, Cap. 14: 253-277 y Cap. 46: 911-935.

Kardos J. 1999. Recent advances in GABA research. *Neurochem Int.* 34: 353-358.

Lillard SJ, Yeung SE y McCloskey MA. 1996. Monitoring exocytosis and release from individual mast cells by capillary electrophoresis with laser-induced native fluorescence detection. *Analchem.* 68: 2897-2904.

Maragakis JN y Rothstein JD. 2004. Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiology Dis.* 15: 461-473.

Massieu L, Morales-Villagran A, Tapia R. 1995. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: An *in vivo* microdialysis study. *J. Neurochem.* 64: 2262-2272.

Medina-Ceja L, Morales-Villagrán A y Tapia R. 2000. Action 4-aminopyridine on extracellular amino acids in hippocampus and entorhinal cortex: A dual microdialysis and electroencephalographic study in awake rats. *Brain Research Bulletin.* 53: 255-262.

Medina-Ceja L, Cordero-Romero A y Morales-Villagran 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

Meldrum BS. 2000. Glutamate as neurotransmitter in the brain. Review of the physiology and pathology. *J Nutr.* 130: 10075-10155.

Mody I, Lambert JD y Heinemann. 1987. Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *JN Physiol.* 3: 869-888.

Mohanty JG, Jaffe JS, Schulman ES y Raible DG. 1997. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *J Immunol Methods.* 202: 133-141.

Montiel T, Camacho A, Estrada-Sánchez AM y Massieu L. 2005. Differential effects of the substrate inhibitor L-*trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC) and the non-substrate inhibitor DL-threo-β-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) of glutamate transporters on neuronal damage and extracellular amino acid levels in rat brain *in vivo*. *J Neurosci.* 133: 667-678.

Mora G y Tapia R. 2005. Effects of retigabine on the neurodegeneration and extracellular glutamate changes induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus *in vivo*. *J Neurochem Res.* 30: 1557-1565.

Morales-Villagrán y Tapia R. 1996. Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum *in vivo*. *J Neurochem Int.* 28: 35-40.

Morales-Villagrán A, Ureña-Guerreo ME y Tapia R. 1996. Protection by NMDA receptor antagonist against seizures induced by intercerebral administration of 4-aminopyridine. *Eur J Pharmacol.* 305: 87-93.

Morales-Villagrán A, Medina-Ceja L y López-Pérez S. 2008. Simultaneous glutamate and EEG activity measurements during seizures in rat hippocampal region with the use of an electrochemical biosensor. *J Neurosci Methods.* 168(1): 48-53.

Nakanishi S. 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *J Science*. 258: 597-603.

Obrenovitch TP, Urenjak J y Zilkha E. 1994. Intracerebral microdialysis combined with recording of extracellular field potential: a novel method: a novel method for investigation of depolarizing drugs *in vivo*. *J Pharmacol*. 113: 1295-1302.

Parpura V, Tong W, Yeung ES y Haydon PG. 1998. Laser-induced native fluorescence (LINF) imaging of serotonin depletion in depolarized neurons. *J Neurosci Methods*. 82: 151-158.

Parrot S, Sauvinet V, Riban V, Depaulis A, Renaud B y Denoroy L. 2004. High temporal resolution for *in vivo* monitoring of neurotransmitters in awake epileptic rats using brain microdialysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Neurosci Methods*. 140: 29-38.

Pella CV. 2006. *Epilepsia*. www.epilepsia.com.mx. 17 de Abril de 2013.

Peña F y Tapia R. 1999. Relationship among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: A microdialysis and electroencephalographic study. *J Neurochem*. 72: 2006-2014.

Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, y Eide L. 1992. Cloning and expression of a rat L-glutamate transporter. *Nature*. 360: 464-467.

Revuelto-Rey J., Egea-Guerrero JJ., Muñoz-Sánchez MA. y Murillo-Cabezas F. 2012. La microdiálisis cerebral en el ámbito clínico actual. Elsevier. *Med Int*. 36: 213-219.

Rhemrev-Boom MM, Jonker MA, Venema K, Tiessen R, Korf J y Jobst G. 2001. On-line continuous monitoring of glucose or lactate by ultraslow microdialysis combined with a flow-through nanoliter biosensor based on poly (*m*-phenylenediamine) ultra-thin polymer membrane as enzyme electrode. *J Analyst.* 126: 1073-1079.

Scimemi A, Schorge S, Kullmann DM y Walter MC. 2006. Epileptogenesis is associated with enhanced glutamatergic transmission in the perforant path. *J Neurophysiol.* 95: 1213-1220.

Schousboe A y Waagepetersen HS. 2006. Glial modulation of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. *Curret Tropics Medical Chemistry.* 6: 929-934.

Shimamoto K, Ishida M, Shinozaki H, y Ohfune Y. 1991. Synthesis of four diastereomeric 1-2-(carboxycyclopropyl) glycines: conformationally constrained L-glutamate analogs. *J Org Chem.* 56:4167–4176.

Siegel GJ, Albers RW, Brady ST y Price DL. 2006. Basic biochemistry, molecular, celular, and medical aspects. Elsevier. Seveth edition. pp. 629-638.

Sierra-Paredes, Galván-Valinete J, Vazquez-Illanes MD, Aguilar-Veiga E y Sierra-Marcuño G. 2000. Effect of ionotropic glutamate receptors antagonist on the modifications in extracellular glutamate and aspartate levels during picrotoxin seizures: a microdialysis study in freely moving rats. *Neurochem Int.* 37: 377-386.

Sim, AT, Herd L, Proctor DT, Baldwin ML, Meunier FA y Rostas JA. 2006. High throughput analysis of endogenous glutamate release using a fluorescence plate reader. *J Neurosci Methods*. 153(1): 43-47.

Smolders I, Khan GH, Lindekens H, Prikken S, Marvin CA, Manil GE y Michotte Y. 1997. Effectiveness of vigabatrin against focally evoked pilocarpine induced seizures and concomitant changes in extracellular hippocampal and cerebellar glutamate, GABA and dopamine levels, a microdialysis electrocortigraphy study in freely moving rats. *J Pharm Exp Therap*. 283: 1239-1248.

Spencer SS y Spencer DD. 1994. Entorhinal-Hippocampal interactions in medial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 35: 721-727.

Squire LR. 2004. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*. 82:171-177.

Tapia R, Medina-Ceja L y Peña F. 1999. On the relationship between extracellular glutamate hyperexcitation and neurodegeneration *in vivo*. *Neurochemistry Intern*. 34: 23-31.

Temkin NR. 2001. Antiepileptogenesis and seizures prevention trials with antiepileptic drugs. *Epilepsia*. 42: 515-524.

Turski L, Ikonomidou C, Turski W, Bortolotto Z y Cavalheiro E. 1989. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse*. 3:154-171.

Wakayama M, Takashima K, Tau Y, Nakashima S, Sakai K y Moriguchi M. 1997. Spectrophotometric assay of D-Aspartate and D-Glutamate using D-

Aspartate oxidase with malate dehydrogenase and Glutamate dehydrogenase. *Anal Biochem.* 250: 252-253.

Williamson A, Patrylo PR y Spencer DD. 1999. Decrease in inhibition in dentate granule cells from patients with medial temporal lobe epilepsy. *Amer Neurol Asssoc.* 45: 92-99.

Wilson CL, Maidment NT, Shomer MH, Behnke EJ, Ackerson L, Fried I y Engel JJ. 1996. Comparison of seizure related amino acid release in human epileptic hippocampus versus a chronic, kainate rat model of hippocampal epilepsy. *Epilepsy Research.* 26: 245-254.

Witter MP y Amaral DG. 2004. Hippocampal formation. *The rat nervous system.* Edited by George Paxinos. Third Edition. Elsevier. 637-686.

Zavala-Tecuapetla C y López-Meráz ML. 2013. Modelos experimentales de epilepsia en ratas en desarrollo. *Neurobiología.* 4. Revista electrónica www.uv.mx/eneurobiología. 25 de Marzo de 2013.