
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Laboratorio de Neurofisiología y Neuroquímica

Departamento de Biología Celular y Molecular



**EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LAS CONEXINAS 32, 36 Y 43 EN
EL HIPOCAMPO DE RATAS CON CRISIS CONVULSIVAS INDUCIDAS POR 4-
AMINOPIRIDINA**

TRABAJO DE TITULACIÓN EN MODALIDAD DE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

CITLALY ROXANNA SÁNCHEZ CASTAÑEDA



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

C. CITLALY ROXANNA SÁNCHEZ CASTAÑEDA.
PRESENTE

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: **"EVALUACIÓN INMONOHISTOQUÍMICA DE LAS CONEXINAS 32, 36 Y 43 EN EL HIPOCAMPO DE RATAS CON CRISIS CONVULSIVAS INDUCIDAS POR 4-AMINOPIRIDINA"**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como directora de dicho trabajo a:
Dra. Laura Guadalupe Medina Ceja.

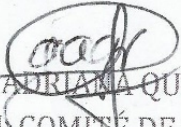
Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"PIENSA Y TRABAJA"


"Año del Centenario de la Escuela Preparatoria de Jalisco"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 18 de septiembre de 2014


DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

COMITE DE
TITULACION




DRA. CLAUDIA AURORA URIBE MÚ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

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 con el título: "EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LAS CONEXINAS 32, 36 Y 43 EN EL HIPOCAMPO DE RATAS CON CRISIS CONVULSIVAS INDUCIDAS POR 4-AMINOPIRIDINA", que realizó la pasante Citlaly Roxanna Sánchez Castañeda con número de código 207427166 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

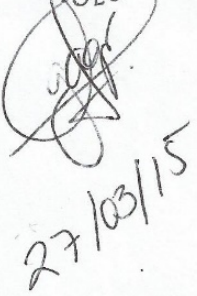
Atentamente


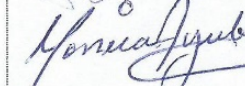


Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco a 25 de Marzo de 2015



Dra. Laura Guadalupe Medina Ceja
 Directora

COMITE DE
 TITULACION

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Alberto Morales Villagran		26/03/2015
Dra. Monica Ayub Ayala		25/03/2015
Dra. Nidia Jannette Carrillo González		26/03/2015
Supl. Dra. Marcela María Jose Rodriguez Baeza		26/03/2015

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en especial a la Dra. Laura Gpe. Medina Ceja por su incondicional apoyo y confianza que me brindo durante mi preparación profesional y desarrollo del proyecto.

Agradezco a mis amigos, en especial a Xóchitl Flores por haberme acompañado y apoyado en la realización de este proyecto.

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

DEDICATORIA

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

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

GRACIAS POR SER MIS PADRES.

A mis hermanos Giselle e Iván por darme su apoyo a pesar de todo y aguantar mis malos ratos.

A mi novio José Dionei por estar en los momentos estresantes, darme tu apoyo, por tus consejos y por siempre estar conmigo, gracias te quiero.

CONTENIDO

ATURAS

I.	INTRODUCCIÓN	1
	1. Epilepsia y modelos experimentales	1
	2. 4-aminopiridina	5
	3. Anatomía funcional del hipocampo de rata	8
II.	ANTECEDENTES	12
	1. Uniones comunicantes (sinapsis eléctricas), estructura y función	12
	2. Uniones comunicantes (sinapsis eléctricas) y epilepsia	15
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
IV.	HIPÓTESIS	20
V.	OBJETIVOS	20
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
	1. Cirugía de implantación de cánulas, grupos de animales y administración de 4-aminopiridina	21
	2. Observación y análisis conductual	22
	3. Perfusión y obtención de cortes histológicos	22
	4. Inmunohistofluorescencia para conexinas, neuronas y células gliales	23
	5. Cuantificación de marca	24
	6. Análisis estadístico	25
	7. Diagrama experimental	26
VII.	RESULTADOS	27
	1. Análisis conductual	27
	2. Inmunohistoquímica por fluorescencia	28
VIII.	DISCUSIÓN	34

IX.	CONCLUSIONES	39
X.	REFERENCIAS	40

GLOSARIO DE FIGURAS

Fig. 1	Mecanismo de acción de la 4-aminopiridina.....	7
Fig. 2	Representación esquemática de la formación hipocámpica y los subcampos.....	10
Fig. 3	Esquema principal del circuito trisináptico del hipocampo.....	11
Fig. 4	Correlato anatómico de las uniones comunicantes (sinapsis eléctricas).....	14
Fig. 5	Posición de la cánula guía.....	21
Fig. 6	Imágenes representativas de tejidos marcados para oligodendrocitos, NeuN y GFAP, del grupo control y experimental.....	29
Fig. 7	Gráficas de la densidad celular de oligodendrocitos y el número de células positivas para NeuN y GFAP del grupo control y experimental	30
Fig. 8	Imágenes representativas de tejidos marcados para las conexinas Cx32, Cx36 y Cx43 del grupo control y experimental	32
Fig. 9	Gráficas de la densidad celular de las conexinas, Cx32, Cx36 y Cx43, del grupo control y experimental	33

GLOSARIO DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de las crisis.....	4
Tabla 2	Tipos de modelos experimentales.....	5
Tabla 3	Trabajos en los que se muestran cambios en la expresión del transcrito de algunas conexinas durante las crisis convulsivas.....	16
Tabla 4	Trabajos en los que se muestran cambios en la expresión proteica de conexinas en diferentes modelos de crisis convulsivas.....	17
Tabla 5	Trabajos en los que se muestran cambios en la expresión de los transcritos de las conexinas asociados con la epilepsia.....	18
Tabla 6	Conducta convulsiva después de la inyección de 4-AP	27

ABREVIATURAS

4-AP	4-Aminopiridina
CA	Cuerno de Ammón
CEd	Corteza Entorrinal Derecha
Cx	Conexina
DAE	Drogas antiepilépticas
EEM	Electro-estimulación máxima
ELT	Epilepsia del Lóbulo Temporal
ESM	Error estándar de la media
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GD	Giro Dentado
I.C.	Intracerebral
I.P.	Intraperitoneal
ILAE	Liga Internacional Contra la Epilepsia "International League Against Epilepsy"
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
NMDA	N-metil-D-aspartato
SNC	Suero normal de cabra

I. INTRODUCCIÓN

1. *Epilepsia y Modelos Experimentales*

La epilepsia es un síndrome de disfunción cerebral, es uno de los desórdenes neurológicos más prevalentes que afecta a 67 millones de personas en el mundo (Angus-Leppan y Parsons, 2008); se caracteriza por la descarga sostenida anormalmente sincrónica de un grupo de neuronas cerebrales. Siendo la actividad epiléptica el resultado de un desequilibrio entre la actividad excitadora por incremento del neurotransmisor glutamato, e inhibidora por una disminución en los niveles de ácido γ -aminobutírico (GABA) (Rowley y cols., 1995; Tapia y cols., 1999; Medina-Ceja y cols., 2000).

La incidencia de la epilepsia en poblaciones de países industrializados se presenta de 25 a 50 casos por 100,000 personas/año (Kotsopoulos y cols. 2002). Mientras que, en países en vías de desarrollo como Chile se observa una tasa considerablemente mayor donde la incidencia es de 114 casos por 100, 000 personas/ año (Lavados y cols. 1992). En los estudios de incidencia por edad, se ha observado que en los países industrializados la epilepsia muestra que las tasas de incidencia son mucho más altas en jóvenes donde el 50% de las crisis aparecen antes de los 20 años mientras que, el 25% se presenta en pacientes de la tercera edad (Lavados y cols. 1992; Rwiza y cols. 1992; Tekle-Haimanot y cols. 1997).

La clasificación de la Epilepsia de acuerdo a la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE, International League Against Epilepsy, por sus siglas en inglés) considera que las crisis se pueden dividir en dos grupos principales; dependiendo si afectan rápidamente a redes distribuidas bilateralmente (crisis generalizadas) o

a redes limitadas a un hemisferio (crisis parciales o focales). No existe una clasificación simplificada de las crisis focales, como la hay para las generalizadas; las crisis focales deben describirse de acuerdo a sus manifestaciones (Tabla 1).

Las crisis convulsivas son una ocurrencia transitoria de signos y/o síntomas debido a una actividad neuronal anormal o sincrónica excesiva en el cerebro, son eventos clínicos transitorios, de inicio brusco, debidos a una descarga neuronal excesiva e hipersincrónica. Éste desorden cerebral, es caracterizado por una predisposición duradera de generar crisis convulsivas con consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales (Fisher y cols, 2005).

Es importante destacar que una crisis convulsiva consiste en una evolución de eventos, cada uno de los cuales presenta diferentes mecanismos y substratos anatómicos que pueden ser modelados y estudiados por separado (Engel y Schwartzkroin, 2006). Esta serie de eventos pueden o no, generar alteraciones fisiopatológicas persistentes suficientes para establecer un daño neuronal con la consecuente aparición de crisis espontáneas.

Para el estudio de los mecanismos básicos de inducción, mantenimiento y extinción de las crisis, se emplean modelos animales con características similares a la epilepsia o crisis convulsivas, esto porque es de suma importancia entender los mecanismos generadores de las crisis epilépticas, en sus diferentes subtipos y circunstancias que permitan presentar propuestas de tratamiento afines (Engel, 2001) además, de emplear estos modelos en la investigación diseñados para planear nuevos enfoques farmacológicos de drogas antiepilépticas (DAE) comprobando su eficacia y seguridad (Engel y Schwartzkroin, 2006). Para este efecto existen diversos modelos donde cada uno puede estar asociado con diferentes mecanismos epileptogénicos al simular algunas de las formas de actividad epiléptica (Commission on Classification and Terminology, ILAE., 2010; Engel y Pedley, 1997), por lo que resulta indispensable identificar el modelo animal apropiado. Los métodos de inducción más comunes son: la electro-

estimulación máxima (EEM), convulsivantes químicos (como es el caso de la penicilina, bicuculina, kainato, pilocarpina, entre otros), trauma y alteraciones metabólicas (como *shock* de insulina) (Engel y Schwartzkroin, 2006).

Estos modelos pueden ser agudos o crónicos; en los modelos agudos generalmente se hace uso de drogas a nivel intracerebral (i.c.) como en el caso de la bicuculina o la 4-aminopiridina (4-AP) y son considerados como modelos convulsivos. Por su parte, los modelos crónicos cambian la estructura y función de regiones cerebrales, condición que incrementa la susceptibilidad a las crisis, como el caso de *Kindling* eléctrico o químico (Dudek y cols., 1998; Jefferys, 2003). Ambos tipos de modelos reproducen crisis parciales y generalizadas; sin embargo, dado que la epilepsia se caracteriza por la aparición de crisis recurrentes a lo largo del tiempo, sólo los modelos que reproducen esa condición se consideran modelos de epilepsia y se clasifican de acuerdo al tipo de crisis manifestada (Tabla 2) (García y cols, 2010).

Tabla 1. Clasificación de las crisis (ILAE, 2010)
1. Generalizadas
Tónico-clónicas
Ausencias
Típicas
Atípicas
Ausencias con características especiales
Ausencias mioclónicas
Ausencias con miclonías palpebrales
Mioclónicas
Mioclónicas
Mioclono atónicas
Mioclono tónicas
Clónicas
Tónicas
Atónicas
2. Crisis Focales
Sin alteración de la conciencia , con componentes motores o autonómicos observables.
Con alteración de la conciencia , o discognitiva
Convulsiva , que evoluciona a una crisis bilateral

Tabla 2. Tipos de modelos experimentales (García y cols., 2010)
Modelos de crisis generalizadas
Modelos modificados genéticamente (se utilizan ratones <i>knock-out</i>)
Modelos genéticamente epileptógenos (hereditario)
Modelo de Ausencias
Modelo de crisis reflejas
Modelo de crisis tónico clónicas generalizadas
Modelos de crisis parciales
Modelos de crisis parciales motrices/sensitivas
Aplicación tópica cortical de metales en la corteza sensitiva o motriz: modelo de cobalto, aluminio o derivados férricos, entre otros.
Lesiones criogénicas focales
Aplicación tópica de sustancias convulsivas: bicuculina, penicilina, picrotoxina, 4-AP.
Estimulación eléctrica aguda
Modelos de epilepsia temporal medial
Fenómeno <i>kindling</i>
Modelo del estado epiléptico o <i>estatus epilepticus</i>

2. 4-Aminopiridina

La 4-AP es una droga que cuando se administra por vía intraperitoneal (i.p.) o i.c. es capaz de inducir crisis convulsivas en diferentes especies de animales (Spyker y cols., 1980; Pasantes-Morales y Azarte, 1981; Tapia y Sitges, 1982; Glover, 1982; Pasantes-Morales y cols., 1987; Mihaly y cols., 1990). El mecanismo de acción de la 4-AP se caracteriza por un bloqueo de los canales de potasio, retardando así la fase de repolarización y manteniendo por más tiempo la

despolarización, lo que conduce a la liberación de neurotransmisores, particularmente de glutamato en el hipocampo (Figura 1) (Morales-Villagrán y Tapia, 1996). El glutamato liberado por más tiempo sobre activa receptores postsinápticos, ionotrópicos y metabotrópicos, lo que favorece la actividad epileptiforme (Medina-Ceja y cols., 2000, 2008).

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

Estudios *in vitro* realizados por Thesleff (1980) han permitido observar que el efecto de la 4-AP sobre la liberación de neurotransmisores es de amplio espectro, es decir, es independiente del tipo de sinapsis o especie. Mediante estudios electrofisiológicos se ha demostrado que la 4-AP bloquea la corriente transitoria de K de inactivación rápida (I_A) y lenta (I_D), lo cual conduce a una prolongación del potencial de acción a través de un retardo en la fase de repolarización, fenómeno que mantiene abiertos los canales de Ca^{++} sensibles al voltaje (Rogawski y Barker, 1983), lo que podría explicar el aumento en la liberación de neurotransmisores.

En trabajos realizados por Morales-Villagrán y Tapia (1996) se demostró que infusiones de 4-AP a través de cánulas de microdiálisis en el núcleo caudado, inducen crisis convulsivas además de una mayor liberación de glutamato respecto

a los demás aminoácidos evaluados. Resulta interesante que las alteraciones motoras producidas por la 4-AP se bloquean por antagonistas del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (Molares-Villagrán y cols., 1996). Trabajos realizados por Molares-Villagrán y colaboradores (1999) han demostrado, con la técnica de microdiálisis dual y registró electroencefalográfico simultáneo en ratas despiertas, que la 4-AP en la corteza motora produce convulsiones intensas y crisis electroencefalográficas tanto en la corteza motora infundida como en la contralateral en la que solo se administra medio Ringer normal.

La actividad del canal de K^+ participa en el control de la liberación de neurotransmisores de las terminales nerviosas determinando el curso temporal de la repolarización, el bloqueo de estos puede prolongar la duración de los potenciales de acción, lo que favorece el retardo en el cierre de los canales de Ca^{++} , incrementando la entrada de este catión y la liberación del neurotransmisor. La 4-AP bloquea los canales de K^+ activados por voltaje en una gran variedad de células, incluyendo las neuronas, el músculo cardíaco, músculo esquelético y liso (Kenyon y Gibbons, 1979; Gillespie y Hunter, 1975; Hara y cols., 1980).

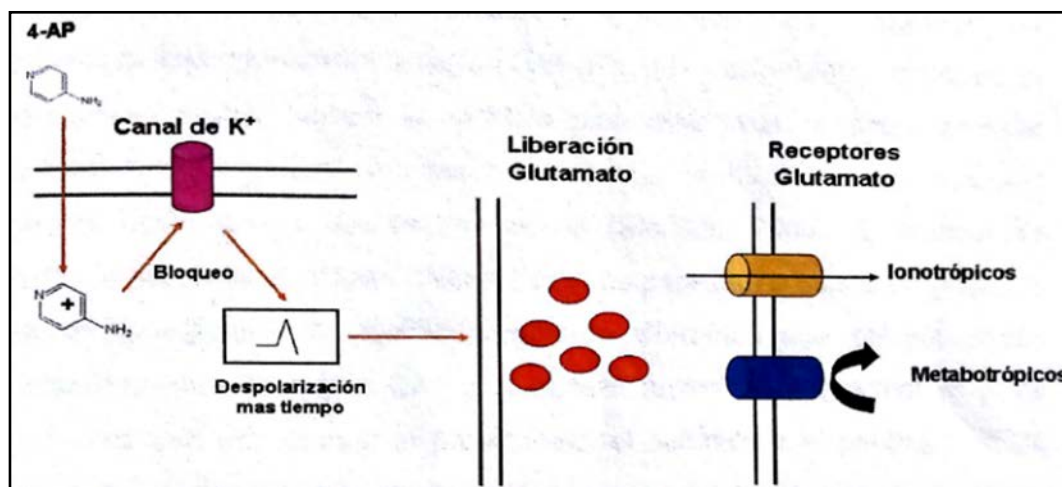


Figura 1. Mecanismo de acción de la 4-AP. Bloquea los canales de potasio, retardando la fase de repolarización y mantiene por más tiempo la despolarización, lo que conduce a la

liberación de neurotransmisores, particularmente de glutamato en el hipocampo. El glutamato liberado sobre activa receptores postsinápticos, ionotrópicos y metabotrópicos, lo que favorece la actividad epileptiforme (Medina-Ceja y cols., 2000, 2008).

3. Anatomía funcional del hipocampo de rata

El hipocampo es una parte filogenéticamente antigua de la corteza que durante el desarrollo se desplaza desde la superficie hacia la parte interna medial del lóbulo temporal. El termino hipocampo hace referencia al cuerno de Ammón (CA) y al giro dentado (GD) y su denominación deriva de su semejanza con el caballito de mar (*hippokampos* en griego) (Squire y cols., 2004). Las neuronas del hipocampo se pueden dividir en dos tipos: las principales (neuronas piramidales localizadas en el CA y células granulares presentes en el GD) y las secundarias que en su gran mayoría han sido reconocidas como interneuronas GABAérgicas que poseen un papel regulatorio sobre las células principales así como en la función general del hipocampo (Freund y Gulyás, 1997). Desde el punto de vista funcional, el hipocampo se le relaciona con funciones de aprendizaje y memoria, siendo una región de particular interés en epilepsia debido a que posee el más bajo umbral para crisis convulsivas de todas las estructuras del sistema nervioso central (Green, 1964).

La formación hipocámpica comprende tres regiones citoarquitectónicamente distintas: el GD, el complejo subicular y el hipocampo propiamente dicho (que comprende las regiones *cornus ammonis* 1 (CA1), 2 (CA2), 3 (CA3) (Figura 2). Las tres regiones de la formación hipocámpica comparten la apariencia característica trilaminar que las define como alo-corteza. El GD es el blanco de la vía perforante formada por axones originados en las capas III y IV de la corteza entorrinal (CE), y es el primer paso del circuito trisináptico intrahipocámpal (Afifi y Bergman, 2005); la CE es considerada como el punto de partida, ya que la mayoría de los impulsos sensoriales captados por la formación hipocámpica entra por la CE, la evidencia experimental sugiere que existe acoplamiento eléctrico

mediante uniones comunicantes entre las células del hipocampo y la CE (Dudek y cols., 1986, 1998; Zsiros y Maccaferri, 2005). A este respecto se ha demostrado que estas estructuras límbicas desempeñan un papel importante en la hipersincronización característica de la actividad epileptiforme por lo que, se consideran sitios importantes para la generación de crisis (Traub y cols., 2001, 2002; Medina-Ceja y Ventura-Mejía, 2010), esta vía es principalmente de naturaleza excitadora (Martina, 2001). Posteriormente las neuronas que se encuentran en la capa II de la CE originan una vía que se proyecta a través del subículo terminando en el GD y la región CA3 del hipocampo (Johnston y Amaral, 2004). Las neuronas que se encuentran en la CE medial presentan terminaciones axónicas que se conectan a la capa molecular del GD y finalmente las células de la CE lateral se unen al tercio externo de esta capa molecular (vía perforante). Estas últimas dos prolongaciones también terminan a manera laminar en el estrato lacunoso-molecular de CA3 y CA2. Las neuronas localizadas en la capa III proyectan a CA1 y subículo (Johnston y Amaral, 2004). El siguiente paso es la proyección de las fibras musgosas de las neuronas granulares del GD a la región CA3, en donde forman sinapsis con las dendritas proximales de las células piramidales de esta región, las cuales interaccionan entre sí. El tercer pasó del circuito está representado por axones de las células piramidales de CA3, las cuales forman colaterales de *Schaffer* que se proyectan en la región CA1 (Figura 3) (Afifi y Bergman, 2005). Las células piramidales en esta última región forman el *stratum pyramidale*; sus dendritas apicales terminan en el *stratum moleculare*, mientras que sus dendritas basales están dentro del *stratum oriens* (Steriade, 2003).



Figura. 2. Representación esquemática de la formación hipocámpica, los sub-campos CA3, CA2, CA1 del hipocampo y giro dentado (GD) (Afifi y Bergman, 2005).

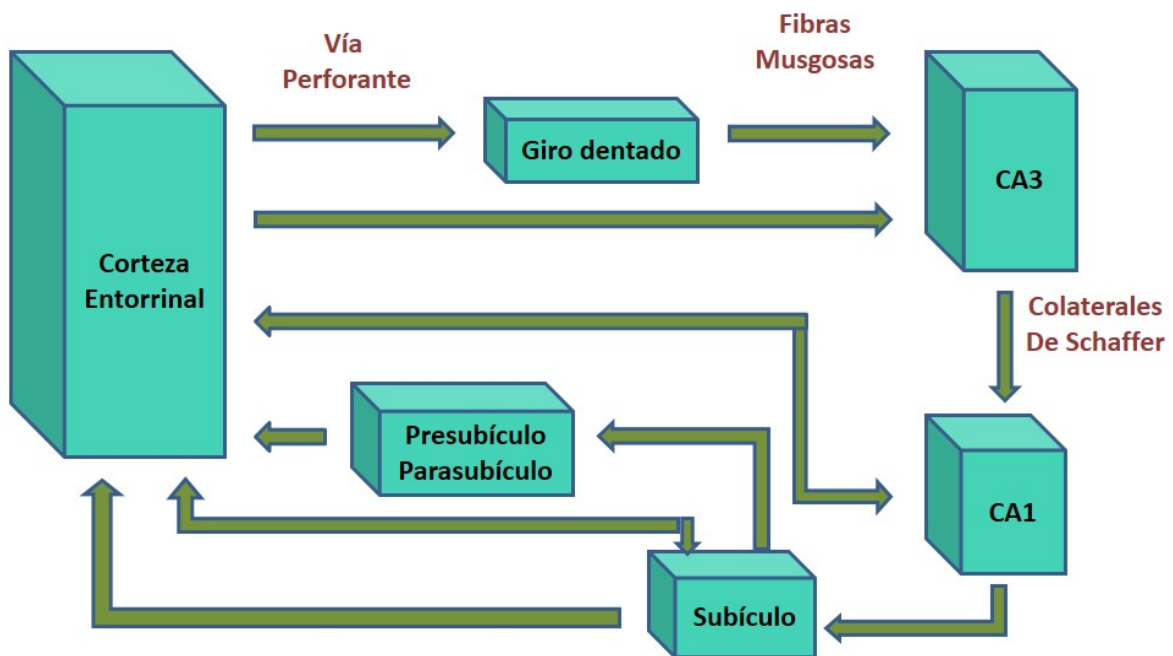


Figura 3. Esquema principal del circuito trisináptico del hipocampo y su relación con otras regiones de la formación hipocámpica (conectividad direccional y bidireccional) (Afifi y Bergman, 2005; Danglot y cols., 2006)

II. ANTECEDENTES

1. Uniones comunicantes (sinapsis eléctricas), estructura y función

Las sinapsis eléctricas permiten la transferencia de corrientes iónicas directamente de una célula nerviosa a otra mediante las uniones comunicantes que conectan los compartimentos citoplasmáticos de una célula con otra de acuerdo a sus gradientes electroquímicos, cambiando el potencial de reposo de la célula nerviosa acoplada eléctricamente. Estas uniones comunicantes se definen como especializaciones de membrana, formadas por la unión de dos hemicanales conocidos como conexones, cada uno de los cuales consiste de 6 subunidades proteicas llamadas conexinas (Figura 4) (Cx seguido de un número que designa el peso molecular de cada una). La conductancia de las uniones comunicantes depende de los tipos de conexinas expresadas entre las células, así como la probabilidad de que estos canales permanezcan abiertos. Cada conexina atraviesa la membrana 4 veces (M1, M2, M3, M4), presentan dos asas externas y una interna, con los extremos amino y carboxilo localizados intercelularmente (Kumar y Gilula, 1996).

Las conexinas se sintetizan en el retículo endoplasmático rugoso donde se pliegan e insertan en vesículas para su transporte hacia el Aparato de Golgi, donde se oligomerizan para conformar los hemicanales o conexones, posteriormente viajan en vesículas a través de microtúbulos a la membrana plasmática, donde se asocia con otro hemicanal de la célula vecina formando el canal completo de la unión comunicante. El recambio de estas proteínas es

rápido, con una vida media promedio de 1-5 horas, con dos vías de degradación: lisosoma y proteosoma siendo esta última la principal vía (Musil y Goodenough, 1993, 1995; Falk, 2000).

Las uniones comunicantes (dentro del sistema nervioso) se localizan en las membranas de dos células en aposición, las cuales pueden ser neurona-neurona, neurona-glía o glía-glía. Las conexinas constituyen una familia de proteínas homólogas que se codifican por diferentes genes (Rouach y cols, 2002). Actualmente en mamíferos se han encontrado 16 conexinas diferentes, de las cuales al menos la Cx26, Cx32, Cx36, Cx43 y Cx47 se expresan en el hipocampo de roedores (Venance y cols, 2000; Teubner y cols, 2001). Por otra parte en células gliales como los astrocitos se ha encontrado una alta expresión de las conexinas Cx26, Cx30 y Cx43, mientras que para los oligodendrocitos las conexinas más abundantes son Cx29, Cx32 y Cx47 a diferencia de la Cx36 que se expresa en abundancia exclusivamente en neuronas (Connors y Long, 2004).

La función de las uniones comunicantes en las células gliales es diversa ya que va desde la disipación de iones de potasio, regulación del volumen celular, el control de la proliferación celular, así como en la propagación de ondas de calcio a través de los astrocitos. En los oligodendrocitos se ha observado la presencia de uniones comunicantes que establecen puentes de comunicación con los astrocitos, lo que permite su acoplamiento metabólico (Mugnaini, 1986; Pastor y cols, 1998; Rash y cols, 2001).

Dudek y colaboradores (1983, 1985, 1998) sugieren que las células piramidales así como las células granulares del hipocampo se encuentran acopladas eléctricamente a través de uniones comunicantes; estudios de registro intracelular con óptica de contraste de interferencia e iluminación diferencial infrarroja (siglas en inglés IR-DIC) han encontrado acoplamiento electrotónico en las células piramidales de la región CA1 de hipocampo a través de sus uniones comunicantes axonales (Schmitz y cols, 2001).

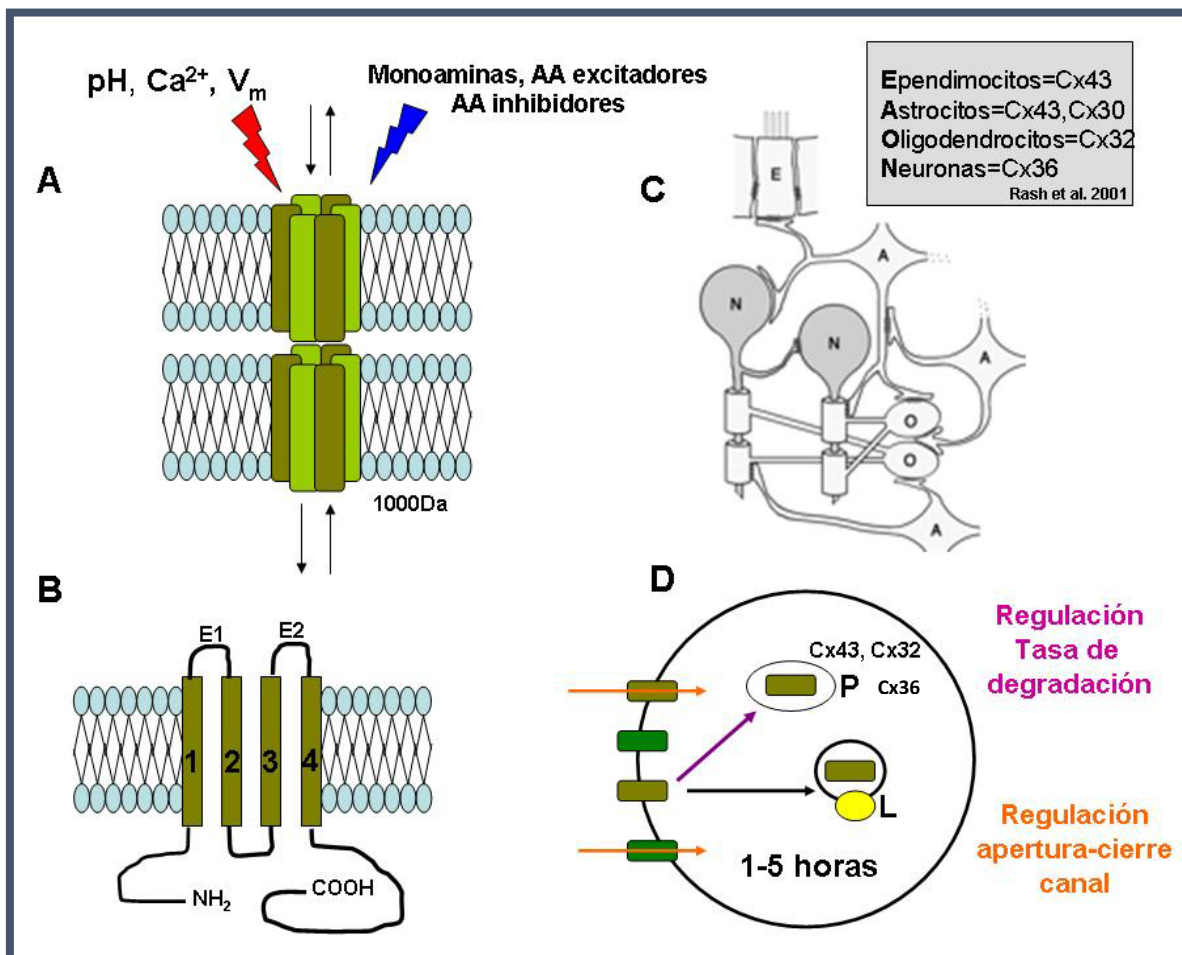


Figura 4. Correlación celular de las uniones comunicantes (sinapsis eléctricas). A) La unión de dos hemicanales o conexones conforman un canal que atraviesa las dos células en aposición (uniones comunicantes) y se ve afectada por varios factores externos e internos. B) Cada conexón está conformado por seis conexinas y cada conexina tiene 4 dominios transmembranales, dos asas externas (E1 y E2) y las regiones amino y carboxilo se encuentran en el citoplasma. C) Los diferentes tipos celulares del sistema

nervioso expresan diferentes conexinas. D) El recambio de las conexinas es rápido oscila entre 1 a 5 horas y su regulación puede incrementar la comunicación intercelular al igual que la apertura de los canales (Rash y cols., 2001; Fong y cols., 2013; Flores y cols., 2011; Mitra y cols., 2006). Abreviaciones: Vm, voltaje de membrana; Cx, conexina; P, proteosoma, L, lisosoma.

2. Uniones comunicantes (*sinapsis eléctricas*) y *epilepsia*

Pérez Velásquez y Carlen, (2000) ha demostrado mediante trabajos *in vitro*, que la actividad epileptiforme se puede presentar aún en ausencia de la neurotransmisión sináptica clásica, destacando la participación del acoplamiento eléctrico a través de uniones comunicantes. También se ha observado que la pérdida del acoplamiento eléctrico, por la presencia de bloqueadores a las uniones comunicantes como la carbenoxolona, octanol y quinina presentan efectos antiepilépticos (Medina-Ceja y cols, 2008; Medina-Ceja y Ventura- Mejía 2010) o por deficiencia de algunas de las proteínas que las conforman (ratones deficientes de alguna Cx) esto en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* (Pérez Velásquez y Carlen, 2000; Ross y cols, 2000; Traub y cols, 2001; Kohling y cols, 2001; Margineanu y Klitgaard, 2001; Jahromi y cols, 2002; Maier y cols, 2002; Pais y cols, 2003; Samoilova y cols, 2003).

Se ha observado en trabajos *in vitro* e *in vivo* que la comunicación a través de las uniones comunicantes entre los diferentes tipos celulares de la neocorteza y del hipocampo de ratas anestesiadas como en libre movimiento, juega un papel fundamental en la expresión, duración y propagación de la actividad epileptiforme inducida por la aplicación de 4-AP (Szente y cols, 2002; Gajda y cols, 2003; Medina-Ceja y cols, 2008; Medina-Ceja y Ventura- Mejía 2010), también se ha encontrado una reducción de los patrones de descargas ya establecidas cuando se administra un pre-tratamiento y post-tratamiento de un bloqueador selectivo

para alguna conexina (Tabla 3). Estudios sobre las uniones comunicantes han mostrado cambios en la expresión de mRNAs y proteínas en modelos animales de epilepsia, en los cuales, se han encontrado alteraciones en la expresión de Cx43 y Cx30 (astrocítica), Cx32 (oligodendrocítica) y Cx36 (neuronal) (Tabla 4); aunque algunos resultados son inconsistentes, estas variaciones pueden deberse a diferencias en la especie, la edad, los modelos animales, los métodos de inducción de convulsiones, puntos de incubación, tiempo de tratamiento, la duración de la actividad convulsiva, y las regiones del cerebro examinadas en cada estudio (Jin y Chen, 2011; Steinhäuser y cols., 2012).

Tabla 3. Trabajos en los que se muestran cambios en la expresión del transcrito de algunas conexinas durante las crisis convulsivas.			
Referencia	Modelo Región Droga administrada	Bloqueadores/ Abridores de Uniones Comunicantes	Resultados
Szente y cols., 2002	<i>In vivo</i> / Neocorteza / 4-AP	CBX / TMA	Incremento de mRNA Cx43, Cx32 post-actividad epileptiforme (AE) CBX= ↓ AE TMA= ↑ AE
Gajda y cols., 2003	<i>In vivo</i> / Neocorteza / 4-AP	CBX / TMA	Incremento de mRNA Cx43, Cx32 y Cx36 (AE) CBX= ↓ AE TMA= ↑ (AE
Samoilova y cols., 2003	<i>In vitro</i> / Hipocampo/ Bicuculina	CBX / octanol	Incremento de mRNA Cx43 y Cx32 (AE) CBX= ↓ AE Octanol= ↓AE

Abreviaciones: 4-aminopiridina (4-AP), Trimetilamina (TMA), Carbenoxolona (CBX).

Tabla 4. Trabajos en los que se muestran cambios en la expresión proteica de conexas en diferentes modelos de crisis convulsivas.			
Referencia	Modelo/ Región/ Droga administrada	Técnica	Resultado
Mylvaganam y cols., 2010	<i>In vitro</i> / Hipocampo / Co ²⁺ (post-natal)	Western blot	Cx43 aumentada (no en forma fosforilada)
Su M., y Tong, 2010	<i>In vivo</i> / Hipocampo / Li + -pilocarpina	Inmunotinción	Aumento de Cx43 en CA1, CA3 y GD.
Samoilova, y cols., 2003	<i>In vitro</i> / Hipocampo/ Bicuculina	Western Blot	Aumento en la Cx43 y Cx32
Li y cols., 2001.	<i>In vitro</i> / Hipocampo/ Bicuculina	Inmunotransferencia	Aumento de la Cx32
Söhl y cols., 2000	<i>In vitro</i> / Hipocampo/ Kindling	Inmunotransferencia	Disminución de Cx36

Abreviaciones: Cobalto (Co²⁺), Litio (Li +).

En la neocorteza de ratas tratadas con 4-AP se ha observado un incremento en los niveles de mRNA para Cx32, Cx36 y Cx43 tanto en la región ipsilateral como contralateral de generación de las crisis en ratas anestesiadas (Gadja y cols, 2003).

En estudios de expresión de las conexinas, realizados con tejido cerebral de pacientes con Epilepsia del Lóbulo Temporal se ha demostrado un aumento en la expresión de la Cx43 en la glía, por lo que se ha sugerido su posible participación en la progresión de este desorden neurológico (Tabla 5), además en tejido epiléptico humano se ha encontrado una alteración en la expresión de varios canales de membrana en la astrogliá, así como de receptores y transportadores, aunque la importancia de estas alteraciones es poco conocida, el funcionamiento astrogliá modificado podría tener un papel importante en la generación y propagación de la actividad convulsiva (Fonseca y cols., 2002).

Se tiene que tomar en cuenta que el número, la composición y la función de las uniones comunicantes está altamente regulada de acuerdo a los requerimientos fisiológicos o a las condiciones patológicas que se presenten, como es el caso de las crisis epileptiformes (Evans y Martin, 2002; Jefferys, 1995; Carlen y cols., 2000; Perez-Velazquez y Carlen, 2000; Li y cols., 2001; Traub y cols., 2001; Zoidl y Dermietzel, 2002). Se ha visto durante la fase de alcalinización mediada por potasio (que se presenta al inicio de los eventos relacionados con las crisis epileptiformes), un aumento en el acoplamiento electrotónico y posteriormente una reducción del mismo, cuando se presenta la fase de acidificación, al final de las crisis (Xiong y cols., 2000), por lo que es posible pensar que la función de las uniones comunicantes a nivel del foco epiléptico se encuentra alterada, aún si la expresión de las conexinas no cambia significativamente (Söhl y cols., 2000).

Tabla 5. Trabajos en los que se muestran cambios en la expresión de los transcritos de las conexinas asociados con la epilepsia.		
Referencia	Condición epiléptica/ Región	Resultados
Naus y cols., 1991	Epilepsia del lóbulo temporal / Neocorteza	Aumento de mRNA Cx32

Collignon y cols., 2006	Epilepsia del lóbulo temporal / Hipocampo	Disminución de mRNA Cx32, no cambios en mRNA Cx36
Jin y Chen, 2011	Epilepsia del lóbulo temporal / Hipocampo y corteza	Aumento de mRNA CX32 y mRNA Cx43
Fonseca y cols., 2002	Crisis generalizadas en la progresión de epilepsia del lóbulo temporal mesial / Hipocampo	Aumento mRNA Cx43

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La epilepsia es un desorden neurológico que afecta del 2-5% de la población mundial. Se caracteriza por la descarga eléctrica sostenida y anormalmente sincrónica de un grupo de neuronas cerebrales. Se ha observado que la actividad epileptiforme se presenta aún en ausencia de sinapsis químicas entre las células del sistema nervioso. Por otro lado, las conexinas (Cx) son proteínas estructurales que forman las uniones comunicantes en el sistema nervioso (sinapsis eléctricas). Se ha demostrado que los bloqueadores de las uniones comunicantes que favorecen la pérdida del acoplamiento eléctrico entre las células, presentan efectos antiepilépticos. Sin embargo, no se conoce con claridad el papel de las Cx en las crisis convulsivas y los reportes publicados muestran resultados contradictorios. Con base en estos argumentos, es de suma importancia evaluar cambios en la inmunohistofluorescencia de las Cx durante las crisis convulsivas, con la finalidad de conocer cuales conexinas se expresan predominantemente para poder sugerir nuevas estrategias terapéuticas. Por lo que en el presente estudio se evaluó las Cx 32, 36 y 43 por inmunohistoquímica en el hipocampo de ratas con crisis convulsivas inducidas por 4-AP.

IV. HIPÓTESIS

Las crisis convulsivas inducidas por 4-AP modificarán la expresión proteica observada por inmunohistofluorescencia de las Cx 32, 36 y 43 en el hipocampo de ratas.

V. OBJETIVOS

General

Evaluar cambios en la inmunohistofluorescencia de las Cx 32, 36 y 43 en el hipocampo de ratas con crisis convulsivas inducidas por 4-AP.

Particulares

1.- Identificar la marca de inmunohistofluorescencia a nivel celular de las Cx 32, 36 y 43 en el hipocampo de ratas correspondientes al grupo control (solución salina al 0.9%) y experimental (4-Aminopirimidina, 10nmoles).

2.- Cuantificar la densidad celular de las Cx32, 36, 43 y de oligodendrocitos, así como cuantificar las células marcadas con NeuN y GFAP en el hipocampo de ratas del grupo control como experimental.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Implantación de cánula, grupos de animales y administración de 4-Aminopiridina

Se utilizaron 9 ratas macho de la cepa Wistar (250-300g de peso), mantenidas en condiciones de bioterio, cuidadas de acuerdo a las Reglas de Investigación en Materia de Salud, con aprobación del Comité Local de Protección de los Animales, se distribuyeron en dos grupos (control y experimental). Las ratas intactas se anestesiaron con isoflurano en oxígeno, se aseguraron en un marco esterotáxico con la barra incisora posicionada a -3.3mm. Posteriormente se implantó una cánula guía (diámetro interno 0.5mm) en la corteza entorrinal derecha (CEd) de acuerdo a las coordenadas: AP= -8mm, ML=4.6mm y DV= 4mm (Figura 5) (Paxinos y Watson, 2009). También se colocó un tornillo con la finalidad de sujetar la cánula con mayor firmeza y se cubrió con acrílico en el cráneo para una mayor fijación. Al final de la cirugía se puso una inyección i.p. con 1ml de penicilina para evitar cualquier infección, los animales estuvieron en recuperación por dos días.

Posteriormente al grupo control (n=3); se les administró NaCl 0.9%, a un flujo 1 µl/min, durante 1 min, y al experimental (n=6) 4-AP (10nmoles), a un flujo 1 µl/min, durante 1 min. Post-inyección se evaluó la conducta convulsiva de acuerdo a la

escala modificada de Racine (Medina-Ceja y cols. 2008) y 60 min posteriores a la administración se sacrificaron para la obtención del cerebro.

Coordenadas (CEd)	
AP	-8 mm
L	4.6 mm
V	4.0 mm

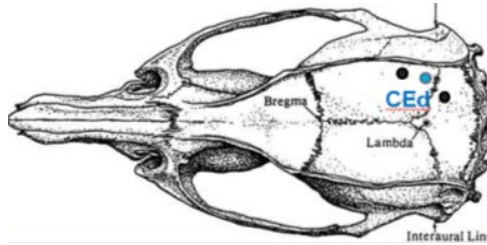


Figura 5. Posición de la cánula guía. En la imagen se muestra donde se coloca la cánula guía en corteza entorrinal derecha (CEd, punto azul) de acuerdo a las coordenadas de la tabla, en ratas Wistar macho (Paxinos y Watson, 2009).

2. Observación y análisis conductual

En general el análisis conductual de todas las ratas en los grupos control y experimental se realizó mediante la observación continua durante y después de la administración de la solución salina y de la 4-AP respectivamente, por 60 minutos. Para el caso del grupo experimental se utilizó la escala de Racine (1972) con modificaciones (Medina-Ceja y cols., 2008), la cual consiste en las siguientes escalas: **0** Paro conductual (inmóvil), piloerección, excitación e hiperventilación. **1** Movimientos de la boca, labios y lengua, movimientos de vibrisas y salivación. **2** Clonus de cabeza y ojos (la cabeza muestra movimientos rápidos y de corta duración). **3** Clonus de extremidades: movimientos flexores de extremidades delanteras, sacudidas de “perro mojado”. **4** Convulsiones clónicas (sacudidas levantando sus extremidades delanteras). **5** Convulsiones clónicas con pérdida de postura y saltos descontrolados.

3. Perfusión y obtención de cortes

Después de 60 min post inyección de 4-AP o solución salina se realizó la perfusión. Se inyectó a los animales por vía intraperitoneal 2.5 ml de pentobarbital

hasta que, el animal estuviera completamente dormido; para colocarlo en la base de plástico que se utiliza para las perfusiones; se dejó expuesta la cavidad torácica hasta observar el corazón, en el ventrículo izquierdo se colocó la aguja y se cortó la aorta; con ayuda de la bomba de perfusión se administró primero la solución salina (0.9%), y posteriormente el paraformaldehído (4%) + glutaraldehído (0.1%). Una vez perfundida la rata, se extrajo el cerebro y se dejó en post fijación de 20 - 24 h para después realizar los cortes de la región del hipocampo, de 30 μ m de espesor en un vibratomo.

4. Inmunohistofluorescencia para conexinas, en neuronas y células gliales

Esta técnica está basada en el trabajo de Söhl y colaboradores (2000). Los cortes histológicos se lavaron con PBS (pH 7.4/ 0.1M) 2 veces en agitación (cada lavado de 15 min); una vez lavados, se incubaron con solución bloqueadora (PBS conteniendo 10% de Suero Normal de Cabra (SNC) y 0.1% de Tritón X-100) durante 30 min, en agitación. Después los cortes se lavaron con PBS 3 veces en agitación (cada lavado de 15 min). Terminados los lavados, los cortes se incubaron por 48 h a 4 °C con los respectivos anticuerpos primarios: anti-Cx32 (anticuerpo monoclonal anti-ratón, Invitrogen, USA); anti Cx36 (anticuerpo policlonal anti-conejo, Invitrogen, USA), anti Cx43 (anticuerpo policlonal anti-conejo, Invitrogen, USA) diluidos 1:500 y anti-Neun (proteína nuclear específica de neuronas; monoclonal hecho en ratón, Millipore, CA., USA), anti-oligodendrocitos (hecho en ratón, monoclonal, Millipore, CA., USA) y anti-GFAP (policlonal, hecho en conejo, Invitrogen, USA) diluidos 1:1000. Las diluciones de los anticuerpos se realizaron con solución bloqueadora (PBS conteniendo 5% de SNC).

Después de 48 h de incubación con el anticuerpo primario, los cortes se lavaron con PBS 5 veces en agitación (cada lavado de 15 min). Al terminar los lavados, los cortes se incubaron con anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 anti-conejo IgG (Invitrogen, USA) para GFAP y Cx36; Alexa Fluor 594 anti-ratón IgG (Invitrogen, USA) para oligodendrocitos; Alexa Fluor 488 anti-ratón IgG (Invitrogen, USA) para Neun y Cx 32; FITC anti-ratón (FITC, Invitrogen, USA) para Cx 43, a una dilución 1:1000 durante 2h a temperatura ambiente y en agitación, la dilución del anticuerpo secundario se realizó con solución bloqueadora (PBS conteniendo 5% de SNC). Las cámaras de incubación fueron cubiertas por completo con papel aluminio para evitar que la luz llegue a los cortes, de lo contrario se puede perder fluorescencia.

Después de 2 h de incubación con anticuerpo secundario, los cortes se lavaron con PBS 4 veces, en agitación y en oscuridad (cada lavado de 15 min). Terminados los lavados, se colocaron en portaobjetos limpios, con la ayuda de pinceles, luego sobre los cortes se coloca el medio de montaje VECTASHIELD (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA) que mantiene la fluorescencia por más tiempo, para cubrirlos posteriormente con un cubreobjetos y los bordes son sellados con esmalte. Una vez secos se guardan a 4°C en total oscuridad para posteriormente observarlos al microscopio de fluorescencia.

5. Cuantificación de marca

Cuantificación de neuronas y astrocitos

Se tomaron imágenes de las regiones de estudio con un microscopio de fluorescencia (Olympus, Japón), posteriormente se cuantificó el número de somas de astrocitos marcados con GFAP y de neuronas NeuN positivos, con ayuda del programa ImageJ 1.48 (NIH, Bethesda, USA), en las regiones de CA1, CA3 de hipocampo derecho e izquierdo y de GD derecho e izquierdo. Con el objetivo 40x se obtuvieron tres fotografías (campos) por región por corte. Cada fotografía equivale a un campo de 0.078mm², se analizaron 2 cortes por rata. A los

resultados obtenidos se les calculó la media y error estándar de la media (Doherty y cols., 2007).

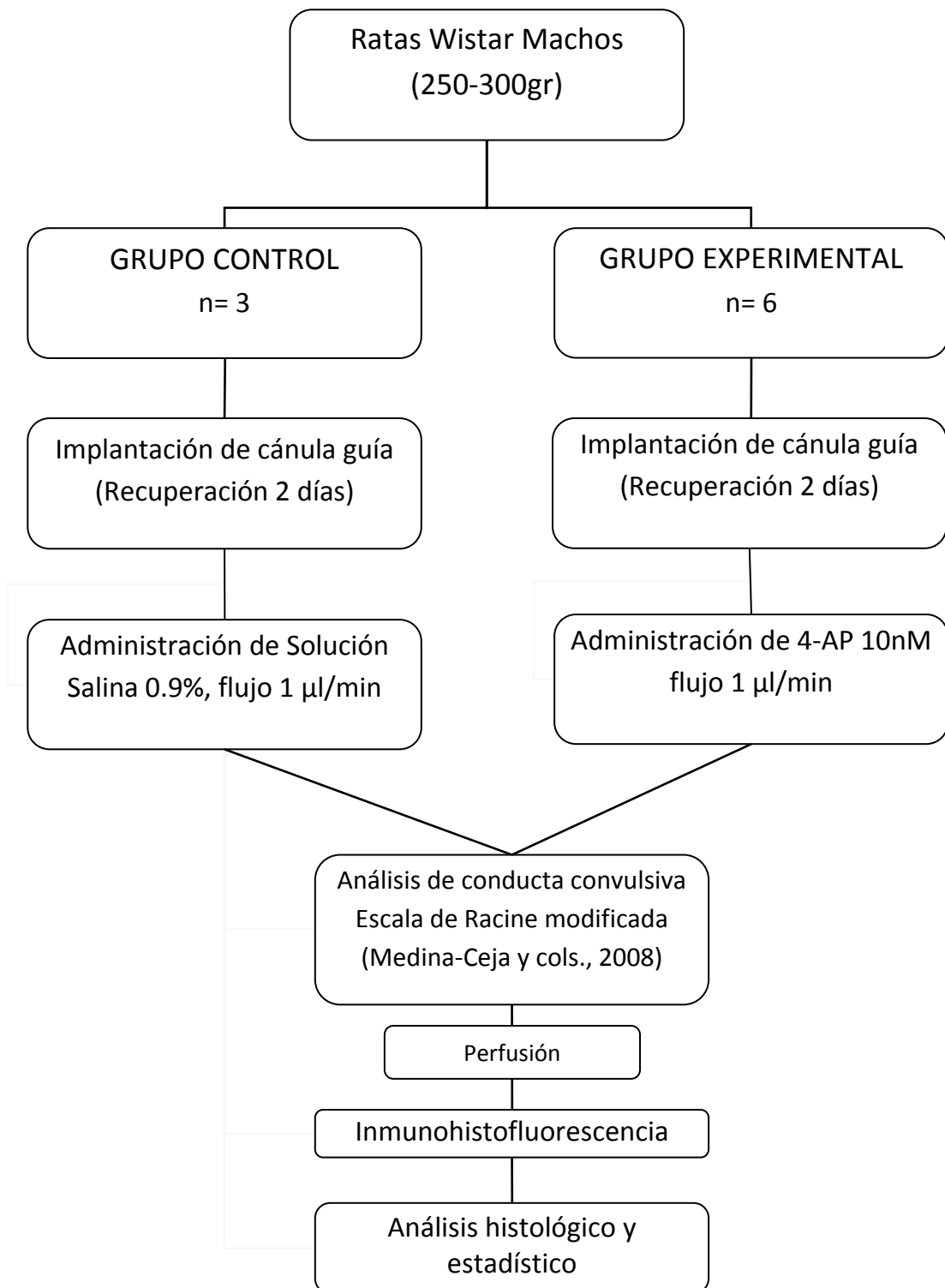
Cuantificación de la densidad

Para evaluar la densidad celular de oligodendrocitos positivos y la densidad de la marca de Cx32, Cx36 y Cx43 positiva se utilizó el programa ImageJ 1.48 (NIH, Bethesda, USA). Se analizaron las regiones CA1, CA3 de hipocampo derecho e izquierdo y de GD derecho e izquierdo. Con el objetivo 40x se obtuvieron tres fotografías (campos) por región por corte. Cada fotografía equivale a un campo de 0.078mm², se determinó la densidad de la marca por campo por región en 2 cortes por rata. A los resultados obtenidos se les calculó la media y error estándar de la media (Doherty y cols., 2007).

6. Análisis estadístico

Los resultados del análisis morfológico se expresaron como promedio \pm ESM del conteo celular o la densidad, esta última expresada en unidades arbitrarias. Las diferencias significativas se calcularon por la prueba t-student, con un valor significativo de $p < 0.05$.

DIAGRAMA EXPERIMENTAL



VII. RESULTADOS

Análisis conductual

En este estudio, los animales tratados con NaCl (0.9%, n=3) del grupo control, presentaron una conducta normal caracterizada por acicalamiento, movimientos masticatorios, conducta exploratoria y periodos de sueño. En contraste, los animales experimentales tratados con 4-AP (10nmoles, n=6) mostraron conducta convulsiva, la cual iniciaba a los 5 minutos posteriores a la administración de la 4-AP, alternando de nivel 0 al 5 de acuerdo a la escala modificada de Racine (Medina-Ceja y col. 2008, Tabla 6): **0** Paro conductual (inmóvil), piloerección, excitación e hiperventilación. **1** Movimientos de la boca, labios y lengua, movimientos de vibrisas y salivación. **2** Clonus de cabeza y ojos (la cabeza muestra movimientos rápidos y de corta duración). **3** Clonus de extremidades: movimientos flexores de extremidades delanteras, sacudidas de “perro mojado”. **4** Convulsiones clónicas (sacudidas levantando sus extremidades delanteras). **5** Convulsiones clónicas con pérdida de postura y saltos descontrolados.

Tabla 6. Conducta convulsiva después de la inyección de 4-AP (10 nmoles) de acuerdo a la escala de Racine Modificada (Medina-Ceja y cols., 2008)				
Rata	Minutos			
	15	30	45	60
1	0/1/2/3/4	3/4	0/4/5	4/3/5
2	0/2/3/4	3/4/2/1	5/3/4	3/4/5
3	0/2/3/1	3/0/1	0/3/1/4	3/1/0/4/5
4	0/3/2	4/0/2/3	0/1/2/3	1/0/3/4/5
5	0/2/1/4	5/3/4	0/1	4/5

6	0/2/3/1	0/3/2/1/0/4	1/2	3/4/5
---	---------	-------------	-----	-------

Inmunohistoquímica por fluorescencia

Marcadores celulares

En la densidad celular de oligodendrocitos positivos, solo se encontró diferencias significativas en las regiones de GD derecho donde hay una mayor densidad en el grupo tratado con 4-AP en comparación con su control (Figura 6, 7). Los resultados del conteo de neuronas positivas a NeuN no mostraron diferencias significativas en CA1, CA3 y GD de la región derecha, sin embargo en CA3 izquierdo se observó una disminución significativa en el número de neuronas con respecto al control (79 ± 0.408 vs. 107 ± 2.299 , $p = <0.05$) (Figura 6, 7). De igual manera, en el conteo de astrocitos positivos a GFAP destaca que no se obtuvieron diferencias significativas en las regiones del hipocampo y GD entre el grupo control y experimental (Figura 6, 7).

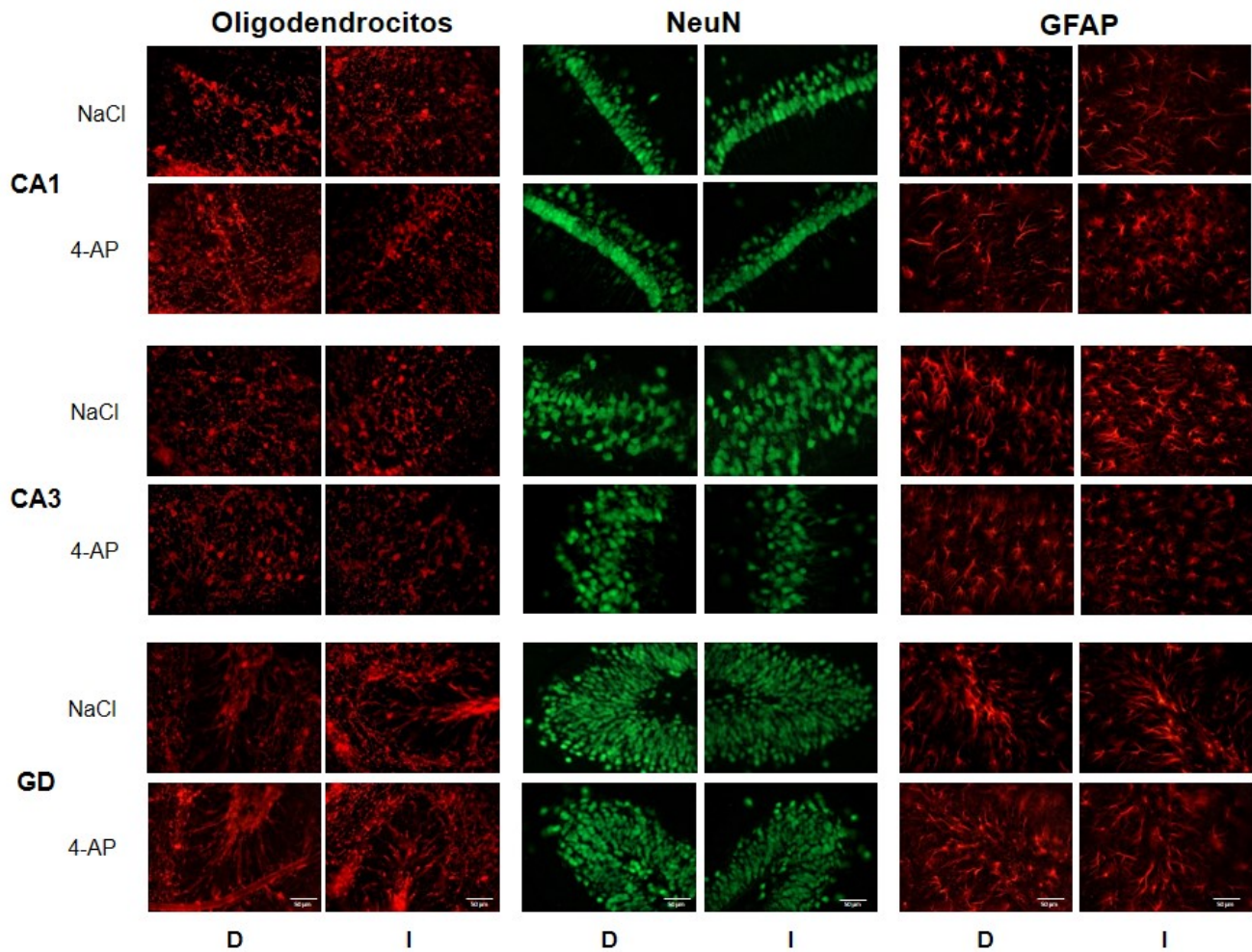
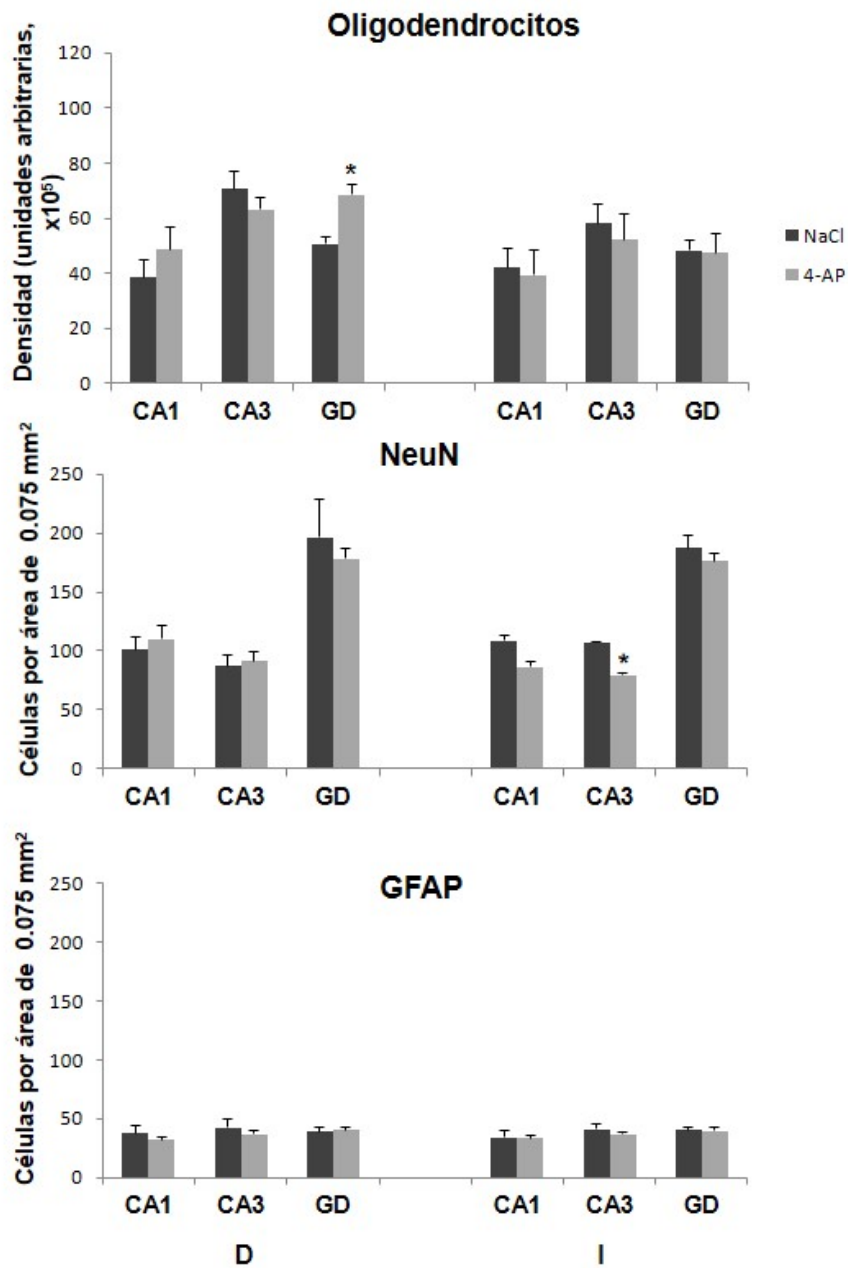


Figura 6. Composición de imágenes representativas de tejidos marcados para oligodendrocitos, NeuN y GFAP, ordenadas por región de estudio CA1, CA3 y giro dentado (GD) del grupo control (NaCl, 0.9%) y experimental (4-AP, 10nmoles) del hemisferio derecho (D) e izquierdo (I). La barra de calibración corresponde a 50 micras.



*p<0.05

Figura 7. Las gráficas muestran el promedio \pm ESM de la densidad celular de oligodendrocitos o el número de células marcadas positivamente para NeuN y GFAP, de las regiones de estudio CA1, CA3 y giro dentado (GD) del hemisferio derecho (D) e izquierdo (I) del grupo control (NaCl, 0.9%) comparado con el grupo experimental (4-AP, 10nmoles).

Marcadores para conexinas

Con respecto a la Cx 32, localizada en los oligodendrocitos, se encontró una densidad celular mayor en el grupo de 4-AP en comparación con el grupo de NaCl, estadísticamente significativa ($p < 0.05$); en las capas piramidales de las regiones CA1, CA3 así como en la capa granular de GD del hemisferio derecho y CA3 de hipocampo izquierdo (Figuras 8, 9), aunque no se encontraron diferencias significativas en las regiones CA1 y GD de hipocampo izquierdo se ve una fuerte tendencia al aumento de la expresión de la Cx32 en el grupo experimental.

Con respecto al marcador de Cx36 localizada en neuronas, en las capas piramidales de las regiones CA1, CA3 así como en la capa granular de GD del hemisferio derecho e izquierdo, no se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo control y experimental (Figuras 8, 9).

Finalmente, los resultados de la Cx43 mostraron una mayor densidad celular estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el grupo experimental de 4-AP con respecto al grupo control con NaCl, en las 3 regiones analizadas tanto del hemisferio derecho como izquierdo (Figuras 8,9).

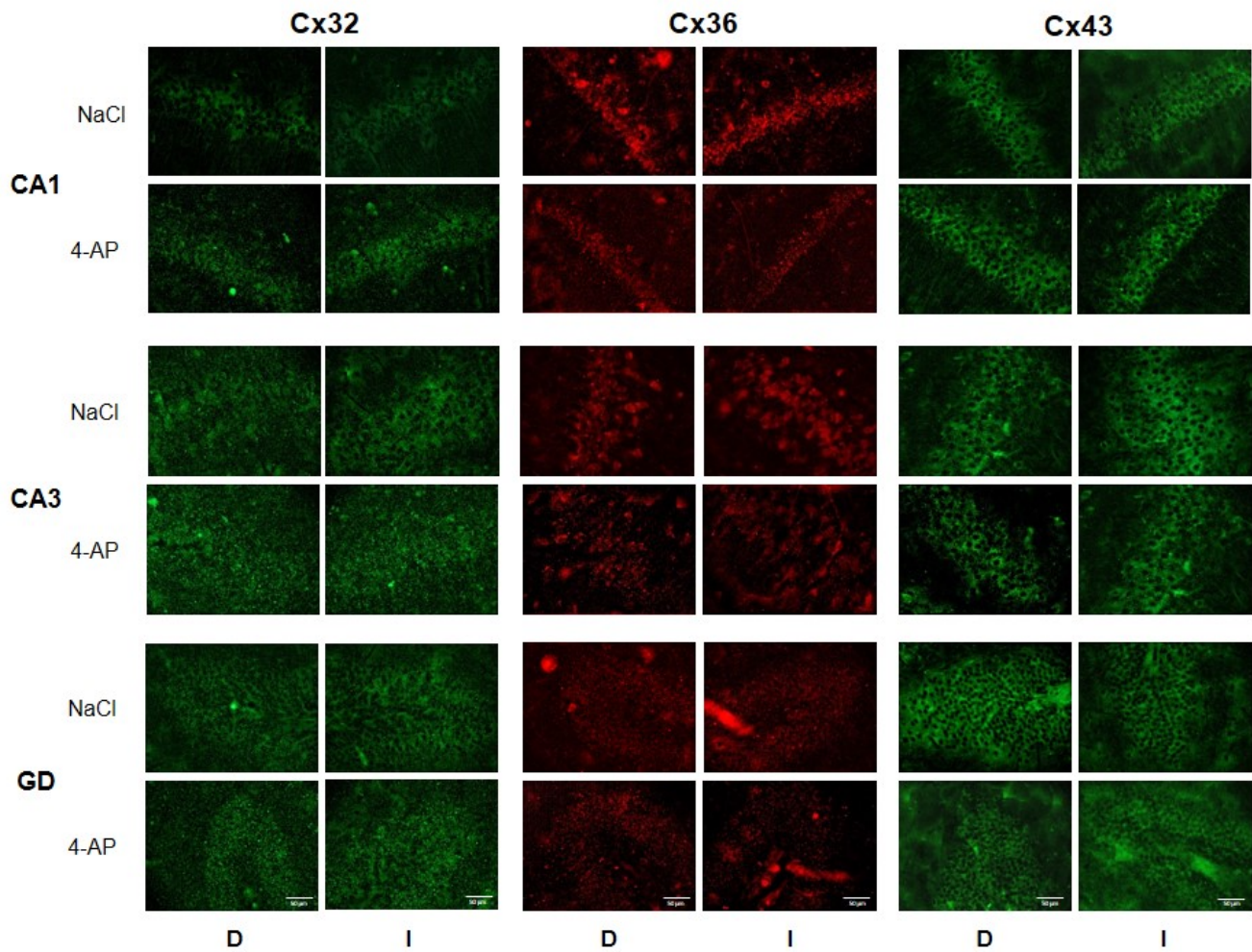


Figura 8. Composición de imágenes representativas de tejidos marcados para las conexinas (Cx) Cx32, Cx36 y Cx43 ordenadas por región CA1, CA3 y giro dentado (GD) del grupo control (NaCl, 0.9%) y experimental (4-AP, 10nmoles) del hemisferio derecho (D) e izquierdo (I). La barra de calibración corresponde a 50 micras.

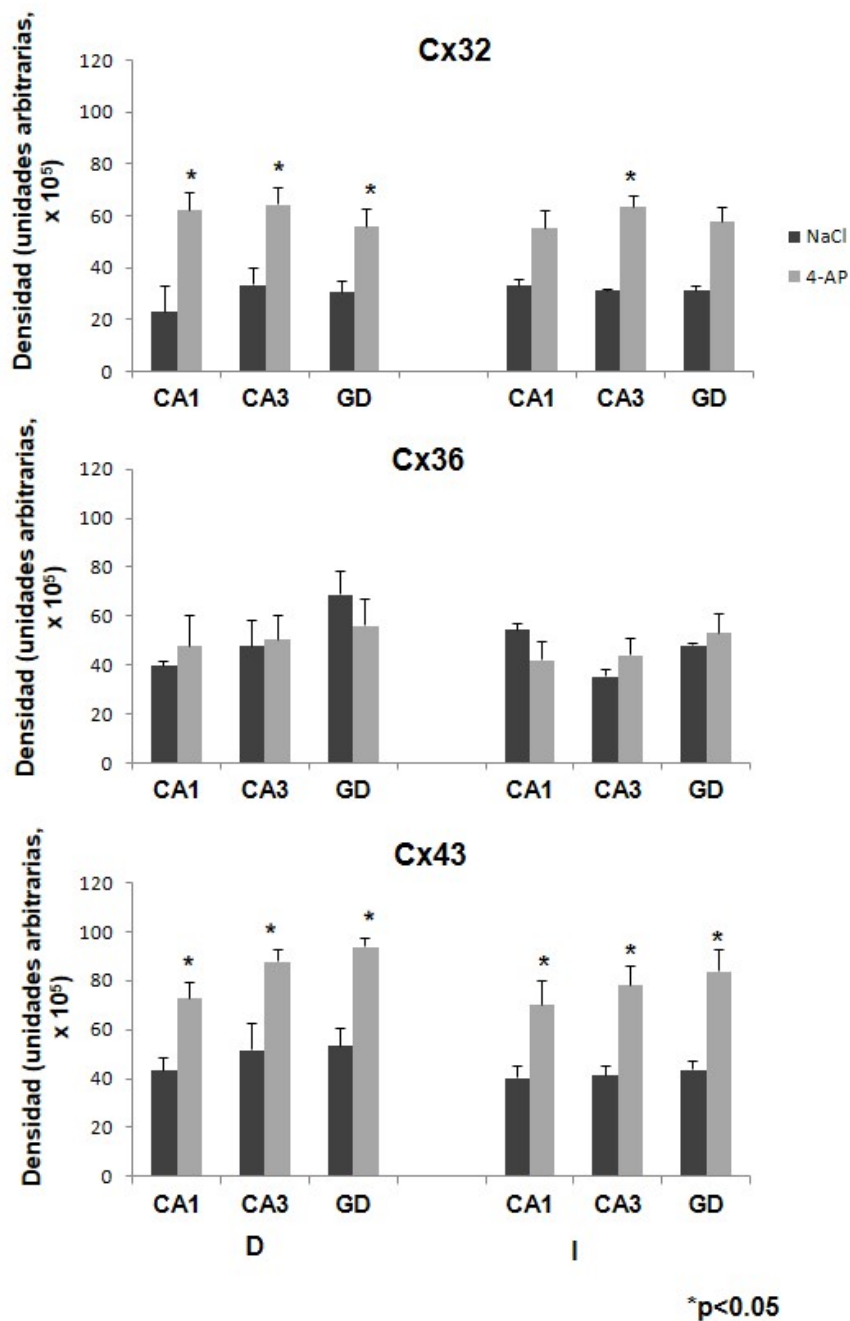


Figura 9. Las gráficas muestran el promedio \pm ESM de la densidad celular de las conexinas (Cx), Cx32, Cx36 y Cx43, de las regiones de estudio CA1, CA3 y giro dentado (GD) del hemisferio derecho (D) e izquierdo (I) del grupo control (NaCl, 0.9%) comparado con el grupo experimental (4-AP, 10nmoles).

VIII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo encontramos que la densidad celular de la Cx32 aumenta en el hipocampo y GD de la rata, particularmente en la región derecha, que corresponde con la región ipsilateral a la aplicación de la 4-AP (CEd). Estos resultados coinciden parcialmente con el aumento en la densidad celular de la marca para oligodendrocitos en la región de GD derecho, considerando que esta Cx se expresa principalmente en este tipo celular. El aumento en la Cx32 observado es similar al encontrado en trabajos previos (Li y cols., 2002; Samoilova y cols., 2003) en donde en preparaciones *in vitro* de hipocampo tratados con bicuculina (antagonista del receptor de GABA) se observó un aumento de la Cx32. Bajo estas mismas condiciones, en el hipocampo derecho de animales tratados con 4-AP (CEd; 60 minutos posteriores a su administración), se observó un aumento en la cantidad de proteína (inmunoensayo) y en el transcrito de la Cx32 (datos no publicados). Datos que no sugieren una posible relación entre la síntesis del mRNA y su traducción durante el evento convulsivo. El aumento del mRNA para Cx32 también se ha observado durante el evento convulsivo inducido por 4-AP en Neocorteza (Szente y cols., 2002; Gajda y cols., 2003), así como en preparaciones *in vitro* de hipocampo con la administración de bicuculina (Samoilova y cols., 2003). Sin embargo, esta relación mRNA-proteína para la Cx32 pudiera permanecer durante el proceso que origina la epileptogénesis, en regiones específicas para la generación de crisis espontáneas y recurrentes; ya que se ha observado en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (ELT) un aumento del mRNA Cx32 en la neocorteza e hipocampo (Naus y cols., 1991; Jin y Chen, 2011). Estos datos nos muestran la importancia del incremento en esta Cx como un mecanismo compensador para contener el proceso convulsivo y epileptogénico. A este respecto, se ha sugerido que las Cx de los oligodendrocitos pudieran contribuir al amortiguamiento del K⁺ liberado durante la actividad neuronal (Kamasawa y cols., 2005; Menichella y cols., 2006) a través del movimiento secuencial de estos iones del citoplasma periaxonal al cuerpo celular

del oligodendrocito a través de uniones reflexivas, que se extiende posteriormente a una red conformada por astrocitos a través de las uniones astrocito-oligodendrocito. Además, los ratones “*knockout*” dobles de Cx32-Cx43 presentan crisis tónico-clónicas y mortalidad temprana (Magnotti y cols., 2011).

Con respecto a la Cx43 expresada particularmente en los astrocitos, se encontró un aumento significativo de la densidad celular en todas las regiones del hipocampo y del GD tanto del hemisferio derecho como izquierdo. Sin embargo, no se encontraron cambios significativos en el número de astrocitos en estas mismas regiones relacionadas con la expresión de la proteína Cx43. Esto puede ser debido a que el proceso de cicatrización glial producida por los astrocitos activos se presenta varios días después de la implantación de la cánula guía o las crisis pueden inducir a una gliosis reactiva generada por la muerte celular inducida por las convulsiones durante el periodo crónico (Cavalheiro y cols., 2006). En nuestro trabajo, los animales fueron utilizados para la fase experimental dos días después de su recuperación de la cirugía y fueron sacrificados una hora posterior a la administración de la 4-AP. Asimismo, el aumento de la proteína Cx43 también se ha observado en preparaciones *in vitro* de hipocampo tras la administración de pilocarpina o bicuculina (Su M., y Tong, 2010; Samoilova y cols., 2003) o en hipocampo extraído de ratas bajo estas mismas condiciones de estudio del presente trabajo (datos no publicados). Además, se ha observado un aumento significativo de los transcritos de la Cx43 *in vivo* e *in vitro* en neocorteza tras la administración de 4-AP, 60 minutos posteriores a la actividad epileptiforme (Szente y cols., 2002; Gajda y cols., 2003), y en preparaciones de hipocampo posterior a la administración de bicuculina (Samoilova y cols., 2003). En trabajos de nuestro laboratorio encontramos una tendencia de incremento en la expresión del mRNA para Cx43 bajo las mismas condiciones experimentales del presente estudio (datos no publicados). Asimismo, en preparaciones de hipocampo extraídos de pacientes con ELT mesial se observó también un aumento en el mRNA de la Cx43 (Fonseca y cols., 2002). Estos datos nos sugieren que la proteína Cx43 es capaz de sintetizarse y distribuirse en los astrocitos bajo

condiciones de hiperexcitabilidad sostenida de 60 minutos de duración. Este incremento en la Cx43 a nivel de astrocitos puede favorecer y sostener la actividad epileptiforme a nivel del hipocampo, como se ha demostrado indirectamente en este mismo modelo en donde la administración de carbenoxolona (bloqueador inespecífico de las Cx que conforman las uniones comunicantes) bloquea la actividad epileptiforme 60 minutos posteriores a la administración de la 4-AP en la CEd (Medina-Ceja y cols., 2008). Además, se ha demostrado que los hemi-canales conformados por la Cx43 se abren tras presentarse cambios en el voltaje de la membrana positivos como durante la actividad epileptiforme (Verselis y Srinivas, 2008); también a través de estas estructuras se activa la liberación de ATP y glutamato de los astrocitos produciendo muerte neuronal, característica en la morfología observada en el tejido epiléptico (Orellana y cols., 2011).

Por otro lado, en el presente trabajo, la expresión de la Cx36 en neuronas del hipocampo y GD no se modifica, 60 minutos posteriores a la administración de 4-AP en CEd; de igual forma el número de neuronas marcadas con NeuN no se modifica en estas mismas regiones analizadas. Estos resultados contrastan con datos obtenidos del propio laboratorio bajo estas mismas condiciones experimentales, en los que se encontró un aumento de la proteína Cx36 (inmunoensayo) pero no del mRNA (datos no publicados). Este último dato concuerda con resultados obtenidos en rebanadas de hipocampo expuestas 18 horas a bicuculina, en donde no se encontraron modificaciones en el transcrito de Cx36 (Samoilova y cols., 2003); sin embargo otros estudios in vivo han demostrado un incremento del mRNA a Cx36, 60 min posteriores a la primera crisis (Gajda y cols., 2003), mientras que otros han observado una reducción significativa en el mRNA de la Cx36 y ligeramente de su proteína en hipocampo extraído de ratas tratadas ácido kaínico, 3 semanas posteriores a su administración y en ratas con kidling (Söhl y cols., 2000). Estas discrepancias en la expresión de la Cx36 pueden deberse a diferencias en la especie, la edad, los modelos animales, y métodos de inducción de convulsiones, puntos de

incubación, tiempo de tratamiento, la duración de la actividad convulsiva, y las regiones del cerebro examinadas en cada estudio. Sin embargo, consideramos que el hecho de no encontrar cambios en la expresión de la Cx36 a nivel de las células principales del hipocampo y GD pero sólo de la cantidad de proteína, se puede deber a que esta Cx en particular tiene una vida media muy rápida de decenas de minutos (Flores y cols., 2011) en comparación con el resto de las Cx32 y Cx43 que en promedio es de 1-4 horas (Mitra y cols., 2006; Fong y cols., 2013), tiempo probablemente suficiente para no observar su distribución a nivel de la membrana celular.

Otro hecho importante es la influencia de factores externos como internos en la regulación de la apertura y cierre de las uniones comunicantes a través de su interacción con las diferentes Cx que las conforman. A este respecto, se ha demostrado que los aminoácidos excitadores e inhibidores regulan el acoplamiento entre las neuronas y los astrocitos, a través de sistemas de señalización mediados por segundos mensajeros o proteínas cinasas (Rouach y cols., 2002). En el presente trabajo, la administración de 4-AP retarda la fase de repolarización de la membrana permitiendo mantenerse por más tiempo despolarizada, lo que induce la liberación excesiva particularmente del glutamato, neurotransmisor que pudiera influir en la conductancia de las uniones comunicantes en el hipocampo y favorecer las crisis. Otros factores que participan en la regulación del acoplamiento eléctrico son el pH y la concentración de calcio intracelular, ya que el incremento en ambos disminuye la conductancia de las uniones comunicantes; al liberarse glutamato al espacio extracelular por 4-AP, éste activa receptores ionotrópicos en las neuronas postsinápticas que modifican el voltaje de sus membrana (despolarizan), aumentan las concentraciones de calcio intracelular y modifican el pH de la célula, factores que permiten la hiperexcitabilidad neuronal. Durante la fase de alcalinización mediada por potasio, que se presenta al inicio de los eventos relacionados con las crisis, se observa un aumento en el acoplamiento electrotónico y posteriormente una reducción del mismo, cuando se presenta la fase de acidificación, al final de las crisis (Xion y

cols. 2000), por lo que es posible pensar que la función de las uniones comunicantes a nivel del foco epiléptico se encuentra alterada, aún si la expresión de las Cx no cambia significativamente.

Con base en los argumentos anteriores, consideramos la posibilidad de que las Cx 32 y 43 particularmente asociadas a las células gliales, como los oligodendrocitos y astrocitos, juegan un papel relevante en las crisis convulsivas posteriores a la administración de 4-AP. Probablemente la participación de la Cx36 asociada a neuronas, se manifieste posteriormente al proceso convulsivo agudo.

IX. CONCLUSIONES

1. La administración de 4-AP en la CEd de la rata produce conducta convulsiva en la escala de Racine modificada de 1 a 5.
2. Las alteraciones conductuales observadas no necesariamente tienen una progresión sucesiva en la escala de Racine modificada.
3. El aumento de la densidad celular de la Cx32 en hipocampo (CA1, CA3) y GD derecho, durante un patrón convulsivo estable, se relaciona con la región ipsilateral a la administración de 4-AP y con un aumento del marcador a oligodendrocitos a nivel del GD derecho.
4. Durante el patrón convulsivo estable inducido por 4-AP, el aumento significativo de la densidad celular para la Cx43 a nivel del hipocampo y GD de ambos hemisferios no se relaciona con cambios significativos en las células marcadas para GFAP.
5. No se presentan cambios significativos en la expresión de la Cx36 o del marcador de neuronas NeuN en el hipocampo y GD (exceptuando CA3 izquierdo) de los animales tratados con 4-AP, lo que nos puede probablemente indicar que esta Cx no participa en el proceso convulsivo agudo.
6. Los resultados previos del laboratorio en conjunto con los presentes nos permiten concluir que las Cx32 y Cx43 asociadas a oligodendrocitos y astrocitos, respectivamente, participan de manera importante en el proceso convulsivo agudo inducido por 4-AP.

X.REFERENCIAS

Afifi-Adel K., Bergman R.A. (2005). Sistema Límbico. Neuroanatomía Funcional. 2da Edición. Mc Graw Hill. México.

Angus-Leppan Heather, y Linda M. Parsons. (2008). Epilepsy: epidemiology, classification and natural history. *Medicine* 36.11: 571-578.

Ben-Ari, Y. (1985). Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 14(2), 375-403.

Carlen, P. L., Skinner, F., Zhang, L., Naus, C., Kushnir, M., y Perez Velazquez, J. L. (2000). The role of gap junctions in seizures. *Brain research reviews*, 32(1), 235-241.

Collignon, F., Wetjen, N. M., Cohen-Gadol, A. A., Cascino, G. D., Parisi, J., Meyer, F. B., y Weigand, S. D. (2006). Altered expression of connexin subtypes in mesial temporal lobe epilepsy in humans. *Journal of neurosurgery*, 105(1), 77-87.

Comission on Classification and Terminology, ILAE. (2010). Terminology and Concept for organization of epilepsies.

Connors B. y Long M. (2004). Electrical synapses in the mammalian brain. *Annual Reviews in Neuroscience* 27: 393-418.

Danglot, L., Triller, A., y Marty, S. (2006). The development of hippocampal interneurons in rodents. *Hippocampus*, 16(12), 1032-1060.

Doherty M, Rostad S, y Haltiner A. (2007). Neocortical Gliosis in Temporal Lobe Epilepsy: Gender-Based Differences. *Epilepsia* 48(8):1455-1459.

Dudek, F. E., Andrew, R. D., MacVicar, B. A., Snow, R. W., y Taylor, C. P. (1983). Recent evidence for and possible significance of gap junctions and

electrotonic synapses in the mammalian brain. *Basic Mechanisms of Neuronal Hyperexcitability*, Alan R. Liss, New York, 31-73.

Dudek, F. E., Snow, R. W., y Taylor, C. P. (1985). Role of electrical interactions in synchronization of epileptiform bursts. *Advances in neurology*, 44, 593-617.

Dudek, F. E., Yasumura, T., y Rash, J. E. (1998). Non-synaptic mechanisms in seizures and epileptogenesis. *Cell biology international*, 22(11-12), 793-805.

Engel Jr, J., y Pedley, T. A. (1997). Introduction: what is epilepsy. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook Volume*, 1.

Engel, J. (2001). Intractable epilepsy: definition and neurobiology. *Epilepsia*, 42.

Engel, J., & Schwartzkroin, P. A. (2006). What should be modeled. *Models of seizures and epilepsy*. Amsterdam: Elsevier, 1-14.

Evans, W. H., y Martin, P. E. (2002). Gap junctions: structure and function (Review). *Molecular membrane biology*, 19(2), 121-136.

Falk, M. M. (2000). Connexin-specific distribution within gap junctions revealed in living cells. *Journal of cell science*, 113(22), 4109-4120.

Fisher, R. S., Boas, W. V. E., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., y Engel, J. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470-472.

Fong, J. T., Kells, R. M., y Falk, M. M. (2013). Two tyrosine-based sorting signals in the Cx43 C-terminus cooperate to mediate gap junction endocytosis. *Molecular biology of the cell*, 24(18), 2834-2848.

Fonseca C. G., Green C. R., y Nicholson N. F. B. (2002). Upregulation in astrocytic connexin 43 gap junction levels may exacerbate generalizad seizures in mesial temporal lobe epilepsy. *Brain Research* 929: 105-116.

Flores, C. E., Nannapaneni, S., Davidson, K. G., Yasumura, T., Bennett, M. V., Rash, J. E., y Pereda, A. E. (2012). Trafficking of gap junction channels at a vertebrate electrical synapse in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(9), E573-E582.

Fragoso-Veloz, J., Massieu, L., Alvarado, R., y Tapia, R. (1990). Seizures and wet-dog shakes induced by 4-aminopyridine, and their potentiation by nifedipine. *European journal of pharmacology*, 178(3), 275-284.

Freund, T. F., y Gulyás, A. I. (1997). Inhibitory control of GABAergic interneurons in the hippocampus. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 75(5), 479-487.

Gajda Z., Gyengesi E., Hermes E., Ali K. S. y Szenté M. (2003). Involvement of gap junctions in the manifestations and control of the duration of seizures in rats in vivo. *Epilepsia* 44: 1596-1600.

Gajda, Z., Szupera, Z., Blazsó, G., y Szenté, M. (2005). Quinine, a blocker of neuronal cx36 channels, suppresses seizure activity in rat neocortex in vivo. *Epilepsia*, 46(10), 1581-1591.

Gandolfo, G., Gottesmann, C., Bidard, J. N. y Lazdunski, M. (1989). Ca⁺⁺ channel blockers prevent seizures induced by a class of K⁺⁺ channel inhibitors. *European journal of pharmacology*, 160(1), 173-177.

García García, M. E., García Morales, I., y Matías Guiu, J. (2010). Modelos experimentales en epilepsia. *Neurología*, 25(3), 181-188.

Gillespie, J. I., y Hutter, O. F. (1975). Proceedings: The actions of 4-aminopyridine on the delayed potassium current in skeletal muscle fibres. *The Journal of physiology*, 252(2), 70P.

Glover, W. E. (1982). The aminopyridines. *General Pharmacology: The Vascular System*, 13(4), 259-285.

Green, J. D. (1964). The hippocampus. *Physiol. Rev*, 44(4), 561-592.

Hara, Y., Kitamura, K., y Kuriyama, H. (1980). Actions of 4-aminopyridine on vascular smooth muscle tissues of the guinea-pig. *British journal of pharmacology*, 68(1), 99-106.

Jahromi, S. S., Wentlandt, K., Piran, S., y Carlen, P. L. (2002). Anticonvulsant actions of gap junctional blockers in an in vitro seizure model. *Journal of neurophysiology*, 88(4), 1893-1902.

Jefferys, J. G. (1995). Nonsynaptic modulation of neuronal activity in the brain: electric currents and extracellular ions. *Physiological reviews*, 75(4), 689-723.

Jefferys, J. G. (2003). Models and mechanisms of experimental epilepsies. *Epilepsia*, 44(s12), 44-50.

Jin, M. M., y Zhong, Chen. (2011). Role of gap junctions in epilepsy. *Neuroscience bulletin*, 27(6), 389-406.

Johnston, D., y Amaral, D. G. (2004). The synaptic organization of the brain. Oxford University Press, Oxford, 455-498.

Kamasawa, N., Sik, A., Morita, M., Yasumura, T., Davidson, K. G. V., Nagy, J. I., y Rash, J. E. (2005). Connexin-47 and connexin-32 in gap junctions of oligodendrocyte somata, myelin sheaths, paranodal loops and Schmidt-Lanterman incisures: implications for ionic homeostasis and potassium siphoning. *Neuroscience*, 136(1), 65-86.

Kenyon, J. L., y Gibbons, W. R. (1979). 4-Aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. *The Journal of general physiology*, 73(2), 139-157.

Köhling, R., Gladwell, S. J., Bracci, E., Vreugdenhil, M., y Jefferys, J. G. R. (2001). Prolonged epileptiform bursting induced by 0-Mg²⁺ in rat hippocampal slices depends on gap junctional coupling. *Neuroscience*, 105(3), 579-587.

Kotsopoulos, I. A., Van Merode, T., Kessels, F. G., De Krom, M. C., y Knottnerus, J. A. (2002). Systematic Review and Meta-analysis of Incidence Studies of Epilepsy and Unprovoked Seizures. *Epilepsia*, 43(11), 1402-1409.

Kumar, N. M., y Gilula, N. B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell*, 84(3), 381-388.

Lavados, J., Germain, L., Morales, A., Campero, M., y Lavados, P. (1992). A descriptive study of epilepsy in the district of El Salvador, Chile, 1984–1988. *Acta neurologica scandinavica*, 85(4), 249-256.

Li, J., Shen, H., Naus, C. C. G., Zhang, L., y Carlen, P. L. (2001). Upregulation of gap junction connexin 32 with epileptiform activity in the isolated mouse hippocampus. *Neuroscience*, 105(3), 589-598.

Maier, N., Güldenagel, M., Söhl, G., Siegmund, H., Willecke, K., y Draguhn, A. (2002). Reduction of high-frequency network oscillations (ripples) and pathological network discharges in hippocampal slices from connexin 36-deficient mice. *The Journal of physiology*, 541(2), 521-528.

Magnotti, L. M., Goodenough, D. A., y Paul, D. L. (2011). Deletion of oligodendrocyte Cx32 and astrocyte Cx43 causes white matter vacuolation, astrocyte loss and early mortality. *Glia*, 59(7), 1064-1074.

Margineanu, D. G., y Klitgaard, H. (2001). Can gap-junction blockade preferentially inhibit neuronal hypersynchrony vs. excitability? *Neuropharmacology*, 41(3), 377-383.

Martina, M., Royer, S., & Paré, D. (2001). Propagation of neocortical inputs in the perirhinal cortex. *The Journal of Neuroscience*, 21(8), 2878-2888.

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

Medina-Ceja, L., Cordero-Romero A. y Morales-Villagrán A. (2008). Antiepileptic effect of carbenoxolone on seizures induced by 4-aminopyridine: a study in the rat hippocampus and entorhinal cortex. *Brain research*, 1187, 74-81.

Medina-Ceja, L., y Ventura-Mejía, C. (2010). Differential effects of trimethylamine and quinine on seizures induced by 4-aminopyridine administration in the entorhinal cortex of vigilant rats. *Seizure*, 19(8), 507-513.

Menichella, D. M., Majdan, M., Awatramani, R., Goodenough, D. A., Sirkowski, E., Scherer, S. S., y Paul, D. L. (2006). Genetic and physiological evidence that oligodendrocyte gap junctions contribute to spatial buffering of potassium released during neuronal activity. *The Journal of neuroscience*, 26(43), 10984-10991.

Mihály, A., Bencsik, K., y Solymosi, T. (1990). Naltrexone potentiates 4-aminopyridine seizures in the rat. *Journal of Neural Transmission/General Section JNT*, 79(1-2), 59-67.

Mitra, S., Annamalai, L., Chakraborty, S., Johnson, K., Song, X. H., Batra, S. K., y Mehta, P. P. (2006). Androgen-regulated formation and degradation of gap junctions in androgen-responsive human prostate cancer cells. *Molecular biology of the cell*, 17(12), 5400-5416.

Morales-Villagrán A., y Tapia R. (1996). Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo. *Neurochemistry International* 28: 35-40.

Morales-Villagrán, A., Ureña-Guerrero, M. E., y Tapia, R. (1996). Protection by NMDA receptor antagonists against seizures induced by intracerebral administration of 4-aminopyridine. *European journal of pharmacology*, 305(1), 87-93.

Morales-Villagrán, A., López-Pérez, S., Medina-Ceja, L., & Tapia, R. (1999). Cortical catecholamine changes and seizures induced by 4-aminopyridine in awake rats, studied with a dual microdialysis-electrical recording technique. *Neuroscience letters*, 275(2), 133-136.

Mugnaini, E. (1986). Cell junctions of astrocytes, ependyma, and related cells in the mammalian central nervous system, with emphasis on the hypothesis of a generalized functional syncytium of supporting cells. *Astrocytes*, 1, 329-371.

Musil, L. S., y Goodenough, D. A. (1993). Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell*, 74(6), 1065-1077.

Musil, L. S., y Goodenough, D. A. (1995). Biochemical analysis of connexon assembly. Intercellular communication through gap junctions. *Progress in cell research*, 4, 327-330.

Mylvaganam, S., Zhang, L., Wu, C., Zhang, Z. J., Samoilova, M., Eubanks, J., y Poulter, M. O. (2010). Hippocampal seizures alter the expression of the pannexin and connexin transcriptome. *Journal of neurochemistry*, 112(1), 92-102.

Naus, C. C., Bechberger, J. F., y Paul, D. L. (1991). Gap junction gene expression in human seizure disorder. *Experimental neurology*, 111(2), 198-203.

Orellana, J. A., Díaz, E., Schalper, K. A., Vargas, A. A., Bennett, M. V., y Sáez, J. C. (2011). Cation permeation through connexin 43 hemichannels is cooperative, competitive and saturable with parameters depending on the permeant species. *Biochemical and biophysical research communications*, 409(4), 603-609.

Pais, I., Hormuzdi, S. G., Monyer, H., Traub, R. D., Wood, I. C., Buhl, E. H., y LeBeau, F. E. (2003). Sharp wave-like activity in the hippocampus in vitro in mice lacking the gap junction protein connexin 36. *Journal of neurophysiology*, 89(4), 2046-2054.

Pasantés-Morales, H., y Arzate, M. E. (1981). Effect of taurine on seizures induced by 4-aminopyridine. *Journal of neuroscience research*, 6(4), 465-474.

Pasantés-Morales, H., Arzate, M. E., Quesada, O., y Huxtable, R. J. (1987). Higher susceptibility of taurine-deficient rats to seizures induced by 4-aminopyridine. *Neuropharmacology*, 26(12), 1721-1725.

Pastor, A., Kremer, M., Möller, T., Kettenmann, H., y Dermietzel, R. (1998). Dye coupling between spinal cord oligodendrocytes: differences in coupling efficiency between gray and white matter. *Glia*, 24(1), 108-120.

Paxinos, G. y Watson, C. (2009). *The Rat Brain, in stereotaxic coordinates. Compact edition.* Academic Press. Elsevier (Ed).

Perez Velazquez, J. L., y Carlen, P. L. (2000). Gap junctions, synchrony and seizures. *Trends in neurosciences*, 23(2), 68-74.

Proulx, É., Leshchenko, Y., Kokarovtseva, L., Khokhotva, V., El-Beheiry, M., Snead, O. C., y Perez Velazquez, J. L. (2006). Functional contribution of specific brain areas to absence seizures: role of thalamic gap-junctional coupling. *European Journal of Neuroscience*, 23(2), 489-496.

Racine, R. J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 32(3), 281-294.

Rash, J. E., Yasumura, T., Dudek, F. E., y Nagy, J. I. (2001). Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *The Journal of Neuroscience*, 21(6), 1983-2000.

Rogawski, M. A., y Barker, J. L. (1983). Effects of 4-aminopyridine on calcium action potentials and calcium current under voltage clamp in spinal neurons. *Brain research*, 280(1), 180-185.

Rouach, N., Avignone, E., Meme, W., Koulakoff, A., Venance, L., Blomstrand, F., y Giaume, C. (2002). Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biology of the Cell*, 94(7-8), 457-475.

Rowley, H. L., Marsden, C. A., y Martin, K. F. (1995). Differential effects of phenytoin and sodium valproate on seizure-induced changes in γ -aminobutyric acid and glutamate release in vivo. *European journal of pharmacology*, 294(2), 541-546.

Rwiza, H. T., Kilonzo, G. P., Haule, J., Matuja, W. B. P., Mteza, I., Mbena, P., y Jilek-Aall, L. M. (1992). Prevalence and Incidence of Epilepsy in Ulanga, a Rural Tanzanian District: A Community-Based Study. *Epilepsia*, 33(6), 1051-1056.

Samoilova, M., Li, J., Pelletier, M. R., Wentlandt, K., Adamchik, Y., Naus, C. C., & Carlen, P. L. (2003). Epileptiform activity in hippocampal slice cultures exposed chronically to bicuculline: increased gap junctional function and expression. *Journal of neurochemistry*, 86(3), 687-699.

Schmitz, D., Schuchmann, S., Fisahn, A., Draguhn, A., Buhl, E. H., Petrasch-Parwez, E., y Traub, R. D. (2001). Axo-axonal coupling: a novel mechanism for ultrafast neuronal communication. *Neuron*, 31(5), 831-840.

Söhl, G., Güldenagel, M., Beck, H., Teubner, B., Traub, O., Gutiérrez, R., y Willecke, K. (2000). Expression of connexin genes in hippocampus of kainate-treated and kindled rats under conditions of experimental epilepsy. *Molecular brain research*, 83(1), 44-51.

Spyker, D. A., Lynch, C., Shabanowitz, J., y Sinn, J. A. (1980). Poisoning with 4-aminopyridine: report of three cases. *Clinical toxicology*, 16(4), 487-497.

Squire, L. R., Stark, C. E., y Clark, R. E. (2004). The medial temporal lobe*. *Annu. Rev. Neurosci.*, 27, 279-306.

Steinhäuser, C., Seifert, G., y Bedner, P. (2012). Astrocyte dysfunction in temporal lobe epilepsy: K⁺ channels and gap junction coupling. *Glia*, 60(8), 1192-1202.

Steriade, M. (2003). *Neuronal substrates of sleep and epilepsy*. Cambridge University Press.

Su, M., y Tong, X. X. (2010). [Astrocytic gap junction in the hippocampus of rats with lithium pilocarpine-induced epilepsy]. *Nan fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University*, 30(12), 2738-2741.

Szente, M., Gajda, Z., Said Ali, K., y Hermes, E. (2002). Involvement of electrical coupling in the *in vivo* ictal epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in the neocortex. *Neuroscience*, 115(4), 1067-1078.

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

Tapia, R., y Sitges, M. (1982). Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain research*, 250(2), 291-299.

Tekle-Haimanot, R., Forsgren, L., y Ekstedt, J. (1997). Incidence of epilepsy in rural central Ethiopia. *Epilepsia*, 38(5), 541-546.

Teubner B., Odermatt B., Güldenagel M., Sóhl G., Degen J., Bukauskas F., Kronengold J., Verselis V. K., Jung Y. T., Kozak C. A., Schilling K., y Willecke K. (2001). Functional expression of the new gap junction gene connexin 47 transcribed in mouse brain and spinal cord neurons. *Journal of Neuroscience* 21: 1117-1126.

Thesleff, S. (1980). Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience*, 5(8), 1413-1419.

Traub, R. D., Bibbig, R., Piechotta, A., Draguhn, R., y Schmitz, D. (2001). Synaptic and nonsynaptic contributions to giant IPSPs and ectopic spikes induced by 4-aminopyridine in the hippocampus in vitro. *Journal of neurophysiology*, 85(3), 1246-1256.

Traub, R. D., Draguhn, A., Whittington, M. A., Baldeweg, T., Bibbig, A., Buhl, E. H., y Schmitz, D. (2002). Axonal gap junctions between principal neurons: a novel source of network oscillations, and perhaps epileptogenesis. *Reviews in the Neurosciences*, 13(1), 1-30.

Venance, L., Rozov, A., Blatow, M., Burnashev, N., Feldmeyer, D., y Monyer, H. (2000). Connexin expression in electrically coupled postnatal rat brain neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(18), 10260-10265.

Verselis, V. K., y Srinivas, M. (2008). Divalent cations regulate connexin hemichannels by modulating intrinsic voltage-dependent gating. *The Journal of general physiology*, 132(3), 315-327.

Xiong, Z. Q., Saggau, P., y Stringer, J. L. (2000). Activity-dependent intracellular acidification correlates with the duration of seizure activity. *The Journal of Neuroscience*, 20(4), 1290-1296.

Zoidl, G., y Dermietzel, R. (2002). On the search for the electrical synapse: a glimpse at the future. *Cell and tissue research*, 310(2), 137-142.

Zsiros, V., y Maccaferri, G. (2005). Electrical coupling between interneurons with different excitable properties in the stratum lacunosum-moleculare of the juvenile CA1 rat hippocampus. *The Journal of neuroscience*, 25(38), 8686-8695.

