



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
EPILEPSIA EXPERIMENTAL

“EFECTO DE LA LESIÓN BILATERAL DE LOS NÚCLEOS DENTADO E
INTERPOSITUS CON ÁCIDO KAÍNICO SOBRE LA MORFOLOGÍA
CEREBRAL Y LA RESPUESTA ELECTROGRÁFICA EN EL MODELO DE
KINDLING AMIGDALINO EN RATA”

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

Q.F.B. MIGUEL HERNÁNDEZ CERÓN

MATRÍCULA: 2113804089

COMITÉ TUTORAL

Tutor: Dr. Carlos Herlindo Paz Tres.

Asesora: Dra. María del Carmen Rubio Osornio.

Asesor: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda.

DICIEMBRE, 2014.

“EFECTO DE LA LESIÓN BILATERAL DE LOS NÚCLEOS DENTADO E INTERPOSITUS CON ÁCIDO KAÍNICO SOBRE LA MORFOLOGÍA CEREBRAL Y LA RESPUESTA ELECTROGRÁFICA EN EL MODELO DE *KINDLING* AMIGDALINO EN RATA”

COMITÉ TUTORAL

Dr. Carlos Herlindo Paz Tres.

Vo. Bo. Tutor

Dra. María del Carmen Rubio Osornio.

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda.

Vo. Bo. Asesora

Vo. Bo. Asesor

Q. F. B. Miguel Hernández Cerón.

Matrícula: 2113804089

“EFECTO DE LA LESIÓN BILATERAL DE LOS NÚCLEOS DENTADO E INTERPOSITUS CON ÁCIDO KAÍNICO SOBRE LA MORFOLOGÍA CEREBRAL Y LA RESPUESTA ELECTROGRÁFICA EN EL MODELO DE *KINDLING* AMIGDALINO EN RATA”

JURADO

Dr. Juan Carlos Martínez Lazcano

M. en C. Verónica Custodio Ramírez

Presidente

Vocal

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda.

Secretario

RESUMEN

La epilepsia tiene una prevalencia entre 1 y 1.5% en la población mundial. Los pacientes con este padecimiento que no responden al tratamiento farmacológico se les recomiendan procedimientos alternativos como los quirúrgicos, consistentes en la ablación de estructuras asociadas al foco epiléptico, siendo la más común la del lóbulo temporal. La descripción de que en el modelo de epilepsia *Kindling* amigdalino, las crisis parciales producidas inicialmente por estimulación eléctrica derivan en crisis generalizadas (CG) como las que se describen en humanos, lo convierte en uno de los modelos más empleados para el estudio de nuevas alternativas farmacológicas y no farmacológicas. Diversas investigaciones demuestran la participación del cerebelo (CB) en esta enfermedad; por ejemplo, lesiones en el núcleo dentado (ND) o núcleo interpositus (NI) disminuyen las CG. Con el propósito de encontrar nuevas alternativas quirúrgicas que eviten la extirpación de tejido nervioso funcional y reacciones adversas graves, se propone evaluar el efecto de lesiones químicas selectivas de estructuras implicadas en la regulación de la actividad epiléptica en ratas con CG producidas por el modelo *kindling*. Para este fin se utilizaron ratas macho de la cepa *Wistar* las cuales fueron implantadas con electrodos para la inducción del *kindling*. Después de siete días de recuperación se estimularon hasta obtener 10 CG, en seguida fueron microinyectadas bilateralmente en el ND o NI con 1µl de ácido kaínico (AK) 5µM, continuándose con la estimulación por 10 días más y sacrificándose al final de este periodo. Nuestros resultados muestran que las lesiones del ND o NI con AK disminuyen la duración de las CG, reduciéndolas a crisis parciales y conjuntamente se revierten los estados conductuales, además de presentar un aumento significativo en las concentraciones del neurotransmisor inhibitorio ácido gama aminobutírico (GABA) en el núcleo rojo (NR). Con base a lo anterior se puede concluir que la reducción de las CG y la reversión de los estados conductuales se debe al aumento de GABA en el NR y su repercusión en la vía cerebelo rubro tálamo cortical, por lo que este trabajo abre un campo de estudio que pudiera ofrecer una alternativa menos invasiva en pacientes con epilepsia de difícil control.

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Departamento de Neurofisiología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, bajo la dirección del Dr. Carlos Herlindo Paz Tres.

AGRADESIMIENTOS INSTITUCIONALES

- *A la Maestría en Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Xochimilco.*

- *Al Departamento de Neurofisiología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.*

- *Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). No. 272111.*

- *Al comité tutorial:*

Tutor: Dr. Carlos Herlindo Paz Tres.

Asesora: Dra. María del Carmen Rubio Osornio.

Asesor: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda.

- *Al jurado:*

Dr. Juan Carlos Martínez Lazcano.

M. en C. Verónica Custodio Ramírez

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- *A Dios.*

- *A mi familia.*

Catalina Cerón Hernández, Ana María Hernández, Carmen Hernández, Leticia Hernández, Jesús Hernández, Antonio Cerón, Nancy Ixtlahuaca, así como a todos mis cuñados, cuñadas y sobrinos. Muy en especial a mi padre Miguel Hernández Rodríguez †.

- *A mis compañeros del INNN.*

Departamento de Neurofisiología, M. en C. Edith González Guevara, Biólogo Francisco Gutiérrez Baeza, y del Departamento de Neuroquímica: Dra. Francisca Pérez Severiano y Dr. Luis Tristan.

- *A México.*

“Los límites son físicos, las limitaciones mentales”

INDICE

RESUMEN.....	i
INDICE.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE GRÁFICAS.....	v
LISTA DE TABLAS.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
II.1 DEFINICIÓN DE LA EPILEPSIA.....	3
II.2 PREVALENCIA DE LA EPILEPSIA.....	4
II.3 FISIOPATOLOGÍA DE LA EPILEPSIA.....	5
II.4 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA EPILEPSIA.....	7
II.5 TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS PARA LA EPILEPSIA.....	7
II.6 VÍA CEREBELO RUBRO TÁLAMO CORTICAL.....	9
II.6.1. Cerebelo.....	10

II.6.1.1 Núcleo Dentado.....	13
II.6.1.2 Núcleo Interpositus.....	14
II.6.2 Núcleo rojo.....	15
II.6.3 Tálamo.....	15
II.6.4 Corteza motora.....	16
II.7 MODELOS DE EPILEPSIA.....	17
II.7.1 Kindling.....	18
II.8 CEREBELO Y EPILEPSIA.....	20
II.9. ÁCIDO KAÍNICO.....	23
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
IV. HIPÓTESIS.....	27
V. OBJETIVOS.....	28
V.1 General.....	28
V.2 Específicos.....	28
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
VI.1 Material biológico.....	29
VI.2 Cirugía.....	29
VI.3 Diseño experimental.....	30

VI.4 Histología.....	31
VI.5 Cromatografía líquida de alta resolución.....	32
VI.6 Análisis estadístico.....	35
VII. RESULTADOS.....	36
VII.1 Registros electrográficos y estados conductuales.....	36
VII.2 Histología.....	39
VII.3 Cromatografía líquida de alta resolución.....	41
VIII. ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
IX. CONCLUSIÓN.....	58
X. REFERENCIAS.....	59
XI. ANEXOS.....	70
XI.1 Eventos científicos.....	70
XI.2 Publicaciones.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido gama aminobutírico (GABA)

Ácido kaínico (AK)

Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxiazol-propiónico (AMPA)

Aminoácidos (aa)

Análisis de varianza (ANOVA)

Área motora primaria (MI)

Área motora suplementaria (MII)

Buffer de fosfatos salino (PBS)

Calcio (Ca^{++})

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Cerebelo (CB)

Cloro (Cl^-)

Corteza motora (CM)

Crisis generalizadas (CG)

Crisis tónico-clónico generalizadas (CTCG)

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Dióxido de carbono (CO_2)

Estado epiléptico (EE)

Formación reticular (FR)

Glutamato (GLUT)

Glutamato descarboxilasa (GAD)

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN)

International League Against Epilepsy (ILAE)

N-Metil-D-Aspartato (NMDA)

Norma Oficial Mexicana (NOM)

Núcleo dentado (ND)

Núcleo interpositus (NI)

Núcleo rojo (NR)

Núcleo tálamico parafascicular (PF)

Núcleo tálamico ventral anterior (VA)

Núcleo tálamico ventral lateral (VL)

Núcleo tálamico ventral posterior (VPPC)

Núcleo tálamico ventromedial (VM)

Organización Mundial de la Salud (OMS)

Orto-ftaldehído (OPA)

Pedúnculo cerebelar superior (PCS)

Pedúnculos cerebelar inferior (PCI)

Pedúnculos cerebelar medio (PCM)

Pos-descarga (PD)

Potasio (K^+)

Potenciación a largo plazo (LTP)

Sistema Nervioso Central (SNC)

Sodio (Na^+)

Tálamo (TM)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de epilepsia en América Latina.

Figura 2. Vía cerebelo rubro tálamo cortical en rata.

Figura 3. Organización celular en el CB.

Figura 4. Corte coronal de CB de rata.

Figura 5. Registro electrográfico del modelo de *kindling* en rata.

Figura 6. Cerebelectomía y *kindling*.

Figura 7. Transección del PCS.

Figura 8. Estimulación del PCS en las CG.

Figura 9. Duración de la PD amigdalina antes de la etapa 5 y durante 10 crisis posteriores.

Figura 10: Estructura molecular de AK.

Figura 11. Neurotoxicidad de AK.

Figura 12. Esquema de CB e identificación de ND y NI.

Figura 13. Evaluación histológica.

Figura 14. Cromatograma de aa estándar.

Figura 15. Cromatograma de aa en tejido de rata.

Figura 16. Cromatograma de la selectividad de los tiempos de retención de GABA y GLUT, en tejido cerebral de rata.

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Desarrollo, establecimiento del modelo y respuesta post-lesión del modelo kindlig amigdalino.

Gráfica 2. Estados conductuales post-lesión.

Gráfica 3. Promedio de reversión de los estados conductuales post-lesión.

Gráfica 4. Curvas de calibración para GLUT y GABA.

Gráfica 5. Concentraciones de GLUT y GABA expresadas en nanomoles por miligramo de tejido en el NR.

Gráfica 6. Concentraciones de GABA y GLUT expresadas en nanomoles por miligramo de tejido del TM.

Gráfica 7. Concentraciones de GABA y GLUT expresadas en nanomoles por miligramo de tejido de la CM.

Gráfica 8. Concentraciones de GABA y GLUT expresadas en nanomoles por miligramo de tejido del CB.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de modelos de epilepsia *in vivo*.

Tabla 2. Linealidad de concentración de GABA y GLUT.

Tabla 3. Repetitividad del método.

Tabla 4. Exactitud del método.

Tabla 5. Se muestran los resultados de la prueba de repetibilidad para 3 concentraciones de GLUT por cuadruplicado.

Tabla 6: Se muestran los resultados de la prueba de repetibilidad para 3 concentraciones de GABA por cuadruplicado.

Tabla 7. Niveles basales de GABA y GLUT y con adición estándar.

I. INTRODUCCIÓN

La epilepsia se puede presentar por la alteración del equilibrio existente entre los estímulos inhibitorios como el GABA, y excitatorios como el Glutamato (GLUT) (Brailowsky y cols., 1989; McNamara, 1994) que regulan una descarga neuronal adecuada. La primera estrategia terapéutica para esta enfermedad es la farmacológica (Velasco y cols., 2013), con una efectividad aproximada del 70% (Meyer y cols., 2010). Cuando las modificaciones de dosis y/o fármacos no logran suprimir las crisis en el restantes 30% de estos pacientes, se les considera de difícil control convirtiéndose en candidatos para someterlos a otras alternativas terapéuticas (Velasco y cols., 2013; Cline y Roos, 2007). Los procedimientos de cirugía paliativa, estimulación cerebral profunda o vagal, radiocirugía y procedimientos de resección, se eligen con la finalidad de bloquear o eliminar el tejido responsable de la descarga neuronal anormal (Alonso V., 2004; Cline y Roos, 2007; Alonso V. y cols., 2010; Xiao-Ling y cols., 2011; Velasco y cols., 2013). Sin embargo, en ocasiones se extirpa tejido nervioso funcional y/o se presentan efectos adversos graves.

Por otra parte, diversas investigaciones evidencian la participación del CB en la epilepsia (Dow y cols., 1962; Guardiola y cols., 1977). Los primeros trabajos experimentales realizando cerebelectomía total en gatos con *kindling* amigdalino, mostraron aumento de la duración de la actividad epiléptica [(pos-descarga (PD))] y las espigas pos-ictales, así mismo provocaron cambios funcionales y anatómicos principalmente en NR y oliva inferior (OI) (Paz y cols., 1985). Además, posterior a la cerebelectomía se describe disminución en las concentraciones de GLUT, aspartato y GABA en el tálamo (TM) a los 7 días y en la corteza a los 15 días, recobrando los niveles de estos aminoácidos (aa) en ambas estructuras a los 30 días posteriores a la cirugía (Cicirata y cols., 1991). Utilizando el mismo modelo de *kindling* en ratas, se demostró que la transección del pedúnculo cerebelar superior (PCS), provocó aumento en el número de estímulos para alcanzar cada uno de los estados conductuales y disminución del tiempo de duración de las CG, además de presentar ataxia al marchar e hipotonicidad en extremidades posteriores (Paz y cols., 1991).

Adicional a esto la estimulación del PCS durante el desarrollo del *kindling* indujo una reducción en el tiempo de duración de las CG, sugiriendo que la estimulación de este núcleo ejerce un efecto de bloqueo que provoca la inactividad temporal del ND y NI (Rubio y cols., 2004). La estimulación eléctrica del ND generó un decremento de la actividad epiléptica inducida por la administración sistémica de penicilina en ratas (Culic, 1994). Lesiones circunscritas de los ND y NI con AK, aceleran el desarrollo de los estados conductuales y disminuyen la duración de las CG, además se observa histológicamente pérdida neuronal en ambos núcleos inyectados (Rubio y cols., 2011). Esto describe que la lesión de ND y NI genera deaferentación e incremento de la actividad de la Glutamato descarboxilasa (GAD) en el NR y núcleo talámico ventral lateral (VL), núcleo talámico ventral anterior (VA) del TM contralaterales. (Nieoullon y Dusticier, 1981). Esta deaferentación selectiva del NR produce incremento de GLUT y de la transmisión GABAérgica corticorubral (Nieoullon y cols., 1988). Con base en estos antecedentes el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la lesión bilateral del ND e NI con AK en el modelo de *kindling* amigdalino en ratas, analizando la morfología cerebral, la respuesta electrográfica y conductual, así como la cuantificación de las concentraciones de GLUT y GABA en CB, TM, NR y corteza motora (CM).

II. ANTECEDENTES

II.1 DEFINICIÓN DE LA EPILEPSIA

La epilepsia es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad cerebral crónica, caracterizada por la presencia de convulsiones repetidas, exhibiendo en ocasiones descontrol de esfínteres y pérdida de la consciencia (OMS, 2014). Este trastorno del cerebro se caracteriza por una predisposición duradera para generar crisis epilépticas y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales [International League Against Epilepsy, 2014 (ILAE)]. La duración de una convulsión en promedio es de uno a dos minutos, también suelen presentarse períodos de déficits neurológicos localizados, como el detrimento de fuerza en manos y piernas, desequilibrios sensitivos, agitación, alucinaciones, sueño, cansancio, y dolor de cabeza (ILAE, 1989).

Este padecimiento fue clasificado desde 1981 por la ILAE, en tres categorías: 1.- epilepsia parcial; 2.- epilepsia generalizada y 3.- epilepsia inclasificable (ILAE, 1981). Sin embargo, en el año 2011 se presentaron otras propuestas de conceptos y terminología, con la finalidad de ir transformando el sistema de clasificación que se había utilizado por uno que logre integrar el conocimiento científico sobre la epilepsia con la parte clínica de la enfermedad (Berg y cols., 2010; Berg y Scheffer, 2011; ILAE, 2014). Así mismo, existen tres grupos principales para describir la etiología de la epilepsia: A).- Epilepsia primaria o Idiopática; B).- Epilepsia criptogénica; y C).- Epilepsia sintomática (Velasco F. y cols., 1989).

II.2 PREVALENCIA DE LA EPILEPSIA

Esta enfermedad afecta en promedio a 50 millones de personas en todo el mundo, de acuerdo a cifras publicadas por la OMS (OMS, 2014), en México el porcentaje reportado oscila entre el 1 y 2 % aproximadamente (McNamara, 1994; García, 2003; Velasco y cols., 2013) (Figura 1).

Prevalencia de epilepsia en América Latina (x 1000)

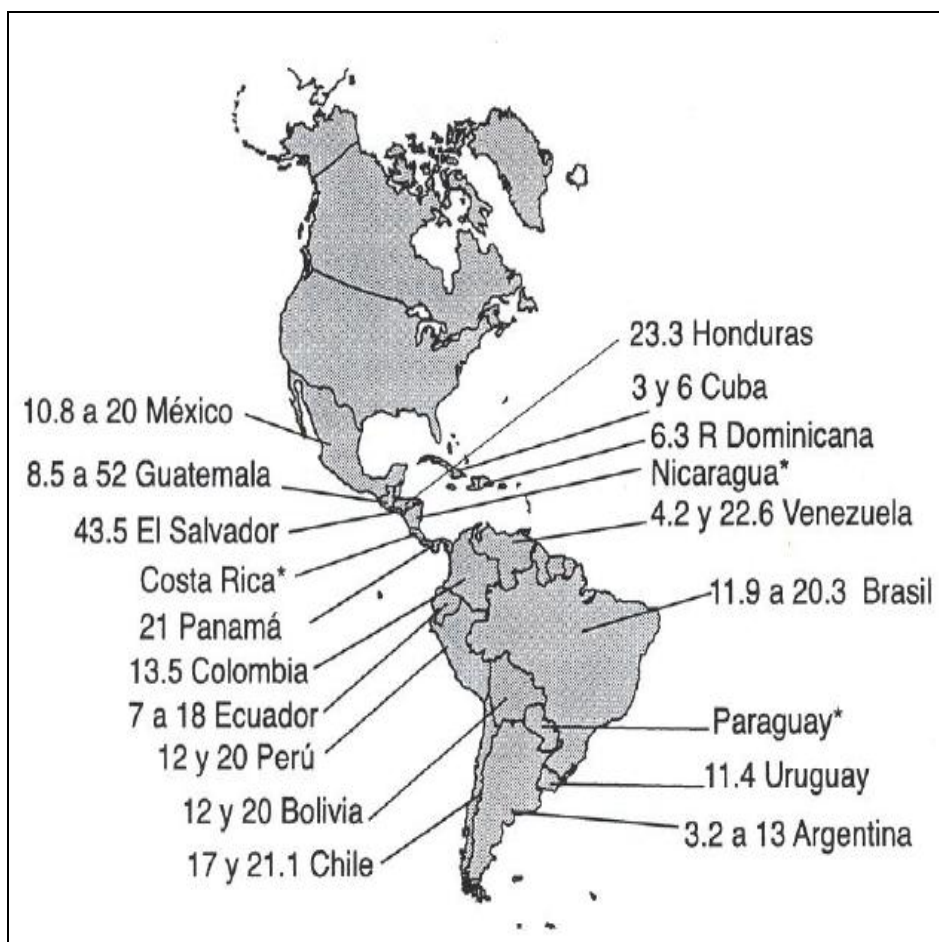


Figura 1. Prevalencia de epilepsia en América Latina. En México la cifra no ha cambiado, continúa siendo de entre el 1 y 2%. En comparación con la prevalencia de otros países, México se encuentra en la media. (Tomado de García, 2003). * = Sin datos.

II.3 FISIOPATOLOGÍA DE LA EPILEPSIA

La epilepsia se puede presentar por la alteración del equilibrio existente entre los estímulos inhibitorios generados por el GABA, cloro (Cl^-) y potasio (K^+), y por los excitatorios establecidos por el GLUT, calcio (Ca^{++}) y sodio (Na^+) principalmente (Brailowsky y cols., 1989; McNamara, 1994), que regulan la descarga neuronal adecuada, que a su vez es iniciada y finalizada por mecanismos no dilucidados plenamente. El fenómeno involucra una estimulación repetida e intensa provocando un foco primario y posteriormente uno secundario, reclutando neuronas normales en un proceso de sincronización y propagación de la descarga, el cual se manifiesta en alteraciones electrofisiológicas como modificaciones paroxísticas de la despolarización, neuroquímicas, morfológicas, anatómicas, histológicas, iónicas, metabólicas y endocrinológicas (Armijo, 2008; Engel, 1989).

La descarga se inicia con la liberación de GLUT y la consecuente activación de los receptores glutamatérgicos para el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxiazol-propiónico (AMPA) o Kainato asociados a canales de Na^+ y K^+ , provocando una rápida entrada de Na^+ , apertura de los canales de K^+ y su salida de la neurona, despolarizando la membrana, como resultado de una serie de potenciales de acción de alta frecuencia (Lallement y cols., 1991; Engel, 1989). Posteriormente esta despolarización inicial desbloquea y activa a los receptores glutamatérgicos para N-Metil-D-Aspartato (NMDA), desencadenando la entrada rápida de Na^+ y una lenta entrada de Ca^{++} lo cual provoca la prolongación de la descarga y la despolarización sostenida (Dingledine y cols., 1999). La hiperpolarización con la cual se restaura el potencial de acción es atribuida a la liberación GABA, propiciando una reacción inhibitoria GABAérgica en la terminal postsináptica asociada a canales de Cl^- , por lo que induce la entrada de este ion y la hiperpolarización (Engel, 1989). Además este neurotransmisor activa los receptores GABA_b , acoplados a proteínas G y segundos mensajeros, que a nivel presináptico provocan la disminución en la liberación de GLUT, así como la apertura de canales de K^+ ,

induciendo una corriente hiperpolarizante para en conjunto restablecer el potencial de reposo neuronal (Miras, 2004).

El GABA se sintetiza a partir del GLUT mediante la acción de la enzima GAD, que descarboxila al GLUT formando GABA más dióxido de carbono (CO₂). De la GAD existen dos isoformas identificadas de acuerdo a su peso molecular como GAD₆₅ y GAD₆₇ (Chusid y Lizarraga, 1983; Battaglioli y Martin, 2003), esta enzima puede ser usada como un biomarcador indirecto de la presencia y preservación de células GABAérgicas (Alexi y cols., 1999). Cabe reiterar que el GABA participa de manera importante en la epilepsia ya que cuando sus concentraciones están disminuidas se desencadenan las crisis (Schwartzkroin, 1993).

Por otro lado, el GLUT es el neurotransmisor excitador más importante del sistema Nervioso Central (SNC), es un aa no esencial que no atraviesa la barrera hematoencefálica, se sintetiza a partir de glutamina mediante la interacción entre las terminales nerviosas y las células gliales (Cotman y cols., 1987). Se une a receptores de tipo ionotrópicos (NMDA, AMPA y Kainato) acoplados a canales de Ca⁺⁺, Na⁺ y K⁺ y a receptores metabotrópicos (acoplados a proteínas G), los cuales son involucrados en la epilepsia (Gilbert, 1988), ya que está descrito que cuando las concentraciones extracelulares de GLUT se incrementan se presentan crisis epilépticas (Ueda y Tsuru, 1994).

II.4 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA EPILEPSIA

La primera estrategia terapéutica para la epilepsia es el tratamiento farmacológico, iniciándose con monoterapia, administrando la dosis adecuada en el tiempo adecuado; así mismo, se debe elegir el mejor medicamento para cada tipo de epilepsia, considerando edad, condiciones del paciente, interacciones medicamentosas, entre otros (Velasco y cols., 2013). Los pacientes tratados con monoterapia responden en un 30 % satisfactoriamente de 2 a 5 años; 20 % puede necesitar politerapia y reincide si se suspende el medicamento, además un 30% son fármaco resistentes (Armijo, 2008). Los pacientes epilépticos de difícil control [pacientes fármaco resistentes y pacientes con estado epiléptico (EE)] son diagnosticados de esa manera después de haber presentado fracaso de una adecuada prescripción en dos fármacos antiepilépticos ya sea como monoterapia o politerapia para lograr la supresión mantenida de crisis (Kwan y cols., 2010), además, otras investigaciones reportan que el porcentaje de éxito de la administración de un tercer fármaco o una politerapia es aproximadamente del 2%, por lo que estos pacientes se convierten en candidatos para someterlos a otras alternativas terapéuticas como la cirugía (Cline y Roos, 2007; Velasco y cols., 2013).

II.5 TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS PARA LA EPILEPSIA

Las alternativas terapéuticas para los pacientes con epilepsia de difícil control son, procedimientos que tienen la finalidad de bloquear o eliminar el tejido responsable de la descarga neuronal anormal, estas pueden ser cirugía paliativa, procedimientos de resección, radiocirugía, estimulación cerebral profunda y del nervio vago (Alonso V., 2004; Cline y Roos, 2007; Alonso V. y cols., 2010; Xiao-Ling y cols., 2011; Velasco y cols., 2013). Sin embargo, se llegan a presentar efectos adversos graves y en ocasiones no se evita la extirpación de tejido nervioso funcional, por lo que se debe tomar en consideración el riesgo-beneficio que implica (Alonso V., 2004).

Para valorar si un paciente es candidato a cirugía se deben considerar de manera individual los factores como la edad, la etiología y enfermedades relacionadas que pueden comprometer la vida, ente otros factores. De los pacientes que son sujetos a evaluación prequirúrgica y remitidos a una unidad especializada, aproximadamente el 5 % podría beneficiarse del tratamiento quirúrgico (Carreño y Serratosa, 2012).

Para la evaluación de pacientes candidatos a cirugía, es preciso contar con un grupo multidisciplinario de especialistas como epileptólogos, neurólogos, neuropediatras, neuropsicólogos, neuropatólogos, neuroquímicos, especialistas en estudio de imagen, personal de enfermería capacitado en el área, etc. Sin embargo, no existe un acuerdo mundial sobre la cantidad de evidencia necesaria para aprobar una cirugía, pero es fundamental la identificación y extensión de la zona epileptógena cuanto mayor sea posible, con la finalidad de evaluar el impacto de la cirugía sobre las funciones neurológicas, emocionales y cognitivas (Carreño y Serratosa, 2012).

La estimulación cerebral profunda como tratamiento para la epilepsia, es un procedimiento que se realiza en los núcleos talámicos y subtalámicos, núcleo caudado, hipotalámico, sustancia nigra y CB entre otros, este estímulo podría regular la generación y propagación de las crisis epilépticas a las estructuras subcorticales. La estimulación cerebelosa activa las células Purkinje, inhibiendo la excitabilidad cerebelosa hacia el TM y la consiguiente disminución de este efecto excitatorio de las proyecciones tálamo corticales (Halpern y cols., 2008; Alonso V., 2004). La estimulación también tiene éxito en los trastornos del movimiento como los que se presentan en la enfermedad de Parkinson. (Halpern y cols., 2008). En la práctica existen una gran cantidad de trabajos clínicos y de investigación básica sobre la estimulación cerebral, por ejemplo la estimulación del VA disminuye las crisis en un 50 %, en más de la mitad de los pacientes de difícil control. Sin embargo, con este procedimiento no se garantiza que los pacientes tengan reducción de crisis, además de que se pueden presentar complicaciones (Xiao-Ling y cols., 2011).

II.6 VÍA CEREBELO RUBRO TÁLAMO CORTICAL

La vía cerebelo rubro tálamo cortical está constituida por una serie de proyecciones, las cuales se inician en los núcleos cerebelosos profundos que proyectan a través del PCS hacia el NR y núcleos talámicos contralaterales, enviando eferencias a la CM (Figura 2). Los núcleos profundos por medio de esta vía regulan la actividad en la CM contralateral, lo cual explica porque esta conexión cruzada de cada hemisferio cerebelar influye en la coordinación y tono muscular del lado contrario del cuerpo (Waxman, 2011). En esta vía las proyecciones desde los núcleo cerebelares profundos hacia el TM con bifurcación en el NR son de tipo glutamatérgicas (Ito, 1984; Monaghan y cols., 1986; Paxinos y Watson, 1998; Cavdar y cols., 2002); las eferencias desde el NR hacia la CM son GABAérgicas (Nieoullon y cols. 1988) y sus aferencias son glutamatérgicas al igual que las eferencias que van del TM a la CM (Afifi y Bergman., 2006; Kiernan., 2006; Snell., 2001; Groenewegen y Witter., 2004).

Vía cerebelo rubro tálamo cortical

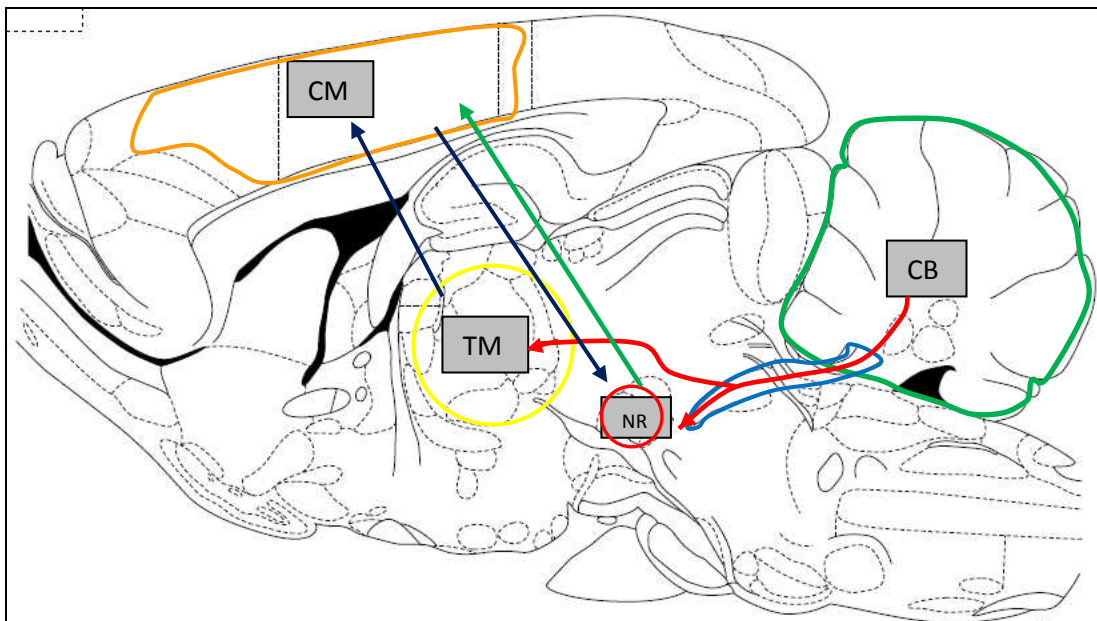


Figura 2. Vía cerebelo rubro tálamo cortical en rata. CB (verde); PCS (azul); NR (rojo), TM (amarillo); CM (anaranjado). Coordenada = lateral 1.40 mm. (Modificado de atlas Paxinos y Watson, 1998). Flecha roja = Vía glutamatérgica (Ito., 1984; Monaghan y cols., 1986; Paxinos y Watson., 1998; Cavdar., y cols., 2002). Flecha verde = Vía GABAérgica (Nieoullon y cols. 1988). Flecha Azul = Vía glutamatérgica (Afifi y Bergman., 2006; Kiernan., 2006; Snell., 2001; Groenewegen y Witter., 2004).

II.6.1 Cerebelo

El CB o cerebro pequeño, se aloja en la parte posterior del encéfalo (Figura 2), se desarrolla a partir de la región sensorial y está relacionado con funciones del control motor como las de coordinar la actividad motora voluntaria, el control del equilibrio y el tono muscular; está constituido por una zona denominada vermis, localizado en la parte central y dos hemisferios a los costados los cuales están cubiertos por una capa de sustancia gris plegada en numerosas circunvoluciones, cinco profundos surcos lo dividen en lóbulos y lobulillos (Ghez y Fahn, 1985). El CB contiene la mitad de neuronas del cerebro (Snell, 2011) y éste se conecta con el mesencéfalo por medio de tres pares de pedúnculos [cerebelar inferior (PCI), cerebelar medio (PCM) y el PCS] por medio de los cuales proyectan eferencias y reciben aferencias de distintas zonas del cerebro; el PCI tiene fibras procedentes del tronco encefálico y la médula espinal; el PCM consta de fibras que provienen de los núcleos pontinos contralaterales, los cuales reciben información de la corteza cerebral; el PCS se constituye de fibras eferentes las cuales se dirigen al TM y medula espinal, con bifurcación al NR (Paxinos y Watson, 1998; Cavdar y cols., 2002; Waxman, 2011).

Las fibras aferentes que llegan principalmente de la corteza cerebral, médula espinal y el sistema vestibular, pasan por medio del PCI, PCM, y en menor valor en el PCS. Las aferencias corticales proceden de la CM y sensorial primaria (Snell, 2001), tiene proyecciones neuronales excitatorias que terminan en fibras trepadoras o en las fibras musgosas en la corteza del CB; las entradas procedentes de la OI también terminan en fibras trepadoras y tienen sinapsis con las dendritas de las células de Purkinje; las fibras musgosas se componen de axones aferentes de los núcleos pontinos, médula espinal, núcleos vestibulares y terminan en glomérulos especializados estableciendo sinapsis con las dendritas de las células granulares (Waxman, 2011).

La corteza cerebelosa está compuesta por un gran número de láminas o folias, que en la rata son 20, orientadas de manera transversal, está compuesta de

tres capas; molecular, media de células de Purkinje y la interna de células granulosas (Ramón y Cajal, 1911). En estas capas se pueden localizar cinco tipos de células, las excitatorias que son las granulosas (glutamatérgica), y las inhibitorias que son las estrelladas (taurinérgica), de canasta, Golgi y las de Purkinje (GABAérgicas) (Figura 3) (Afifi y Bergman, 2006).

Organización celular en el CB

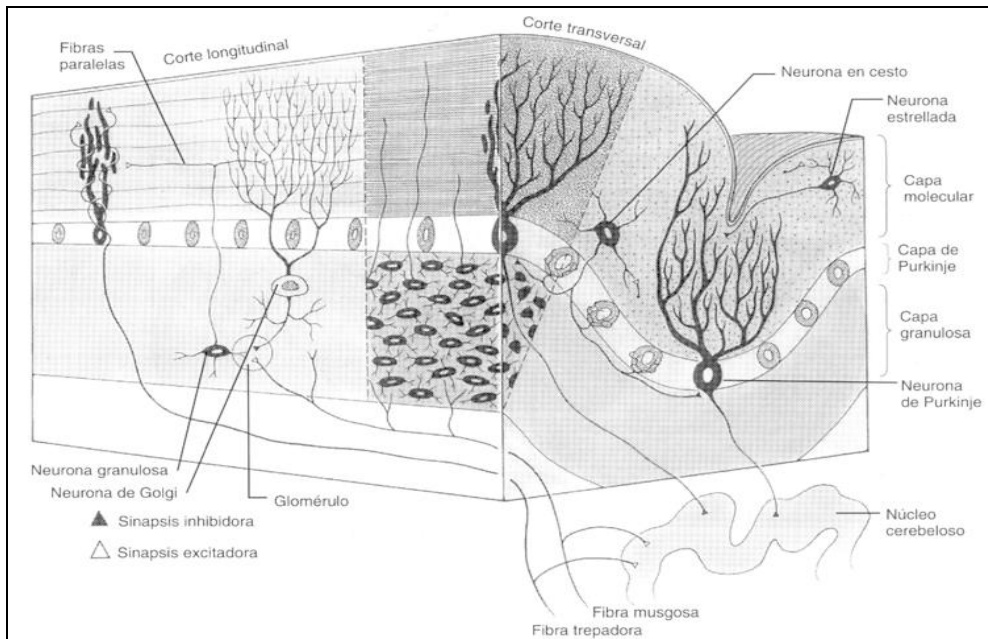


Figura 3. Organización celular en el CB. La corteza cerebelosa muestra la ubicación de las tres capas en las cuales se divide, así como la organización de los cinco tipos celulares presentes en ella. (Tomada de Snell., 2001).

En la capa molecular se sitúan las células en cesta, las cuales reciben estímulos excitatorios de las fibras paralelas, para proyectarse de manera inhibitoria en las células de Purkinje, también las células estrelladas se localizan en esta capa y reciben estímulos excitatorios de las fibras paralelas, y éstas influyen inhibitoriamente en las células de Purkinje debido a que sus dendritas están inmersas en esta misma capa al igual que las dendritas de las células de Golgi. Las células de Golgi se localizan en la capa granulosa, reciben información excitatoria de las fibras paralelas y de las fibras musgosas, sus axones se proyectan a las células granulares inhibiéndolas. Las células granulares, las únicas neuronas excitatorias en la corteza cerebelar se localizan en la capa granular, proyectan sus axones de forma ascendente dentro de la capa molecular y bifurcan en forma de T para convertirse en fibras

paralelas las cuales son perpendiculares a las dendritas de las células de Purkinje. Las células de Purkinje, tienen sus cuerpos neuronales localizados en la capa de células de Purkinje y sus dendritas se distribuyen en forma de abanico en un solo plano, éstas aportan la principal salida de información de la corteza cerebelar. Sus axones se proyectan a los núcleos cerebelosos profundos estableciendo sinapsis inhibitorias (Waxman, 2011; Afifi y Bergman, 2006).

Los núcleos cerebelosos localizados profundamente en la masa cerebelosa en la rata son tres: ND, NI y fastigial, los cuales proyectan axones a diferentes estructuras cerebrales, como el TM, NR, núcleo vestibular, locus coeruleus, núcleos pontinos, tallo, núcleo reticular y OI (Herrick, 1924). Todas las señales que entran y salen del cerebro hacia el CB y viceversa pasan por los núcleos cerebelosos a través de los pedúnculos cerebelosos, siendo de gran interés las eferencias del PCS donde se forman la mayoría de fibras dirigidas hacia zonas del TM, como el núcleo tálamico parafascicular (PF), VL, núcleo tálamico ventromedial (VM), VA y núcleo tálamico ventral posterior (VPPC), así como recalcar su bifurcación hacia el NR (Waxman, 2011). Sin embargo, hay otras vías de comunicación como el del núcleo fastigial que se encuentra localizado a un costado de la línea media y se comunica con el cerebro a través del PCI, influyendo en el tono de los músculos extensores homolaterales (Snell, 2001).

Esta reportado que el CB ejerce un importante dominio en la CM a través del TM (Afifi y Bergman, 2006); debido a que las neuronas de la CM reciben influencias excitatorias de los núcleos ND y NI una vez que estos axones establecen contactos con los distintos núcleos del TM y NR (Ito, 1984; Holschneider y cols., 2007; Gonzalez y Bernard, 2012; Carl, 1987). Hasta el momento se describe que las células del ND y NI son principalmente glutamatérgicas y aspartatérgicas. Las proyecciones hacia la OI pudieran ser de naturaleza GABAérgica mientras que las eferencias al NR, núcleos del TM y CM pueden ser de tipo glutamatérgico (Waxman, 2011).

II.6.1.1 Núcleo Dentado

El ND o núcleo lateral está ubicado a un costado del NI (Figura 4), morfológicamente está dividido en una parte ventrocaudal y una rostral, es el de mayor tamaño y la población de células varía dependiendo de la especie, tiene forma de bolsa con pliegues abierta hacia delante y hacia la línea media; la abertura se denomina hilio del ND y por él salen la mayor parte de las fibras (Voogd, 1967). En éste se distinguen al menos dos tipos de neuronas: las grandes o de proyección y las pequeñas o interneuronas (Czubayko y cols., 2001) además hay un área libre de células que separa el NI y ND (George Paxinos, 1985).

Las células del ND son de tipo glutamatérgicas y aspartatérgicas (Monaghan y cols., 1986). Tanto las neuronas de proyección como las interneuronas tienen prolongaciones no muy numerosas, largas y poco ramificadas, que les dan un aspecto general estrellado. El ND como el resto de los núcleos cerebelosos, recibe estímulos inhibitorios por medio de los axones de las células de Purkinje, además de que las fibras trepadoras y las musgosas excitan al núcleo (Ito, 1984). La mayor parte de sus eferencias son a través del PCS, decusan en la formación reticular (FR) mesencefálica, establecen contactos sinápticos con el núcleo intersticial de Cajal, el núcleo de Darkschewjsch, NR, y principalmente establecen contactos con las células de varios núcleos tálamicos como el PF, VL, VM, VA y VPPC, y finalmente con la CM. (Ito, 1984; Cavdar, y cols., 2002; Snell, 2001). Investigaciones recientes indican que el ND tiene proyecciones hacia la CM (Bostan y cols., 2013). El ND se asocia con actividades motoras iniciadas en otras partes del sistema nervioso, contribuye al control de los movimientos voluntarios proporcionándoles precisión y coordinación, regula la contracción de los músculos esqueléticos, controla los impulsos necesarios para llevar a cabo cada movimiento, apreciando la velocidad y calculando el tiempo que se necesitará para alcanzar un punto deseado. Así mismo, frena los movimientos en el momento adecuado, además ayuda a predecir las posiciones futuras de las extremidades (Snell, 2001).

II.6.1.2 Núcleo Interpositus

El NI está ubicado entre el ND y fastigial (Figura 4), morfológicamente se encuentra dividido en una parte anterior y otra posterior. Éste contiene células grandes y pequeñas (Czubayko y cols., 2001) y existe una zona libre de células que separa ambos núcleos (George Paxinos, 1985). Las células de Purkinje inhibitorias conectan a la red cortical cerebelar con éste núcleo, además de aferencias excitadoras de los nervios periféricos como por ejemplo la entrada desde la corteza sensoriomotora. Al igual que el ND el NI conecta con distintos núcleos del TM (Cavdar y cols., 2002), y el NR recibe aferencias desde éste núcleo (Gonzalez y Bernard, 2012). Cuenta de igual forma que el ND con dos tipos de neuronas glutamatérgicas y aspartatérgicas (Ito, 1984). Además está relacionado con funciones cognitivas como el aprendizaje motor asociativo (Lu y cols., 2012).

Núcleos de cerebelo de rata

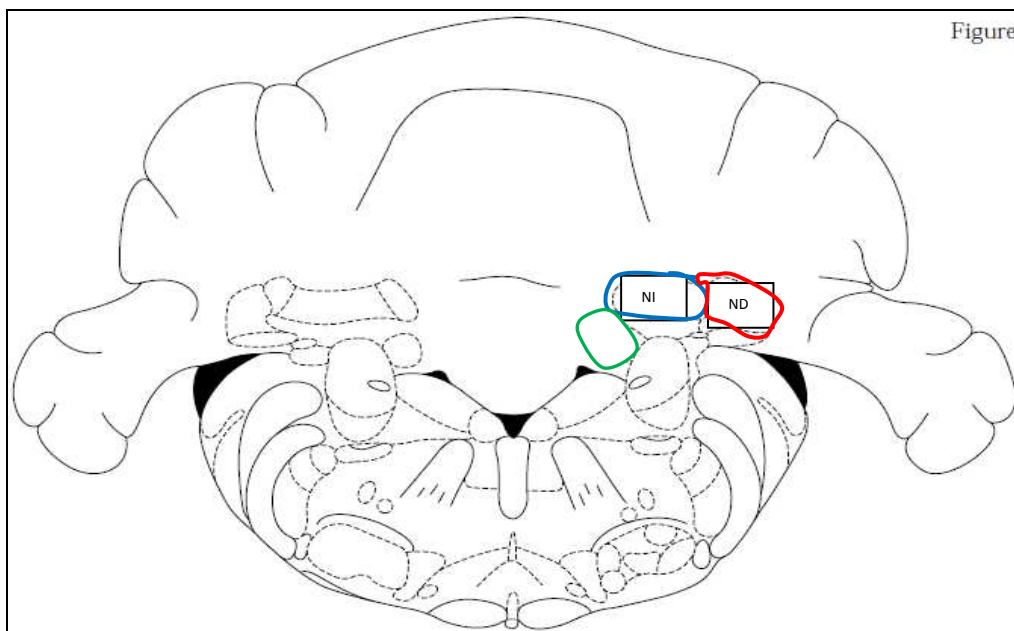


Figura 4. Corte coronal de CB de rata. Se observa la localización del núcleo fastigial (verde), NI (azul); y ND (rojo). Coordenada = Interaural -2.3 mm. (Modificada del atlas Paxinos y Watson, 1998).

II.6.2 Núcleo rojo

El NR (Figura 2) recibe este nombre debido a su tonalidad rosada producto de su considerable vascularización, éste se localiza en el tegmento mesencefálico a nivel del colículo superior y está formado de una parte rostral con células filogenéticamente recientes y de una parte caudal con células grandes filogenéticamente más antiguas. El NR recibe conexiones aferentes del CB a través de los núcleos cerebelosos profundos además de la corteza cerebral. Las fibras del ND terminan en la parte rostral y las del NI a la parte caudal del NR y éste proyecta hacia la médula espinal, FR, CB, TM, sustancia negra y a la OI (Afifi y Bergman, 2006; Kiernan, 2006; Snell, 2001).

II.6.3 Tálamo

El TM (Figura 2) se localiza en cada lado del tercer ventrículo y constituye la mayor parte del diencefalo, se caracteriza por ser una masa ovoide de sustancia gris (Snell, 2001; Groenewegen y Witter, 2004). Tiene la función de ser una estructura que sirve como estación celular o relevo para todos los sistemas sensitivos principales, excluyendo solamente al olfatorio. Uno de los principales núcleos del TM es el VL el cual juega un rol de gran relevancia en la integración motora y sus fibras aferentes comprenden a los núcleos cerebelosos profundos, principalmente del ND (Cavdar y cols., 2002), y la MI. Sus fibras eferentes pasan hacia las áreas de la corteza motora primaria (MI), motora suplementaria (MII) y premotora (Afifi y Bergman, 2006). Tanto el VA como el VL son considerados el principal relevo motor del TM a la corteza cerebral, lo que constituye un punto de convergencia para las fibras nerviosas de los sistemas cerebelar y extrapiramidal (Groenewegen y Witter, 2004).

II.6.4 Corteza motora

La corteza cerebral está constituida por una capa de sustancia gris que envuelve el núcleo de la sustancia blanca y los hemisferios cerebrales; la CM (Figura 2) la cual se relaciona con el control motor voluntario es una región de esta corteza cerebral, subdividida en 3 zonas corticales principales: MI, MII y área premotora.

La MI comprende al giro precentral (área 4 de *Brodmann*) y sus principales aferencias la forman otras áreas motoras de la corteza (áreas 1, 2 y 5), la corteza somestésica y la división posterior del VL (Bostan y cols., 2013). Las fibras eferentes están incluidas en el sistema piramidal y cuenta con neuronas que proyectan axones que terminan en las regiones motoras de la FR.

El MII está localizada en la superficie medial del lóbulo frontal (área 6 de *Brodmann*), y se relaciona ampliamente con la organización temporal del movimiento, ejecución secuencial de múltiples movimientos y en labores motoras que requieren de la recuperación de la memoria motora (Afifi y Bergman., 2006). La MII cuenta con aferencias de otras regiones de la corteza cerebral, del VL y VA. Además, recibe aferencias del CB a través de los ganglios basales. Sus eferencias se dirigen hacia los fascículos corticoespinales, a las regiones motoras de la FR y al MI (Kiernan, 2006).

El área premotora se encuentra en el lóbulo frontal, enfrente del MI y se relaciona con la función motora voluntaria dependiente de aferencias sensoriales, además de contar con eferencias dirigidas a los sistemas piramidal y extrapiramidal (Afifi y Bergman, 2006).

II.7 MODELOS DE EPILEPSIA

Por la alta incidencia y el difícil control de las crisis epilépticas, se emplean distintos modelos experimentales (genéticos, eléctricos y químicos) que simulan la actividad epiléptica, con el propósito de apoyar el estudio de los mecanismos y nuevas alternativas terapéuticas. Estos modelos presentan alteraciones en el ambiente iónico celular, exagerada actividad excitatoria de neurotransmisores y cambios estructurales en las neuronas, caracterizados por pérdida de las espinas dendríticas en hipocampo y amígdala (Fisher, 1989; Brailowsky y cols., 1997; Hallak y cols., 1993; Standley y cols., 1995), además de la presencia de sprouting (crecimiento dendrítico) (Sutula y cols., 1996) (Tabla 1).

Modelos de crisis parciales
Neocorticales:
Estimulación eléctrica aguda Administración de metales Kindling neocortical
Límbicas:
Estimulación eléctrica aguda Aplicación de metales Administración local o sistémica de ácido kaínico Kindling
Modelos de fenómeno epiléptico generalizado de tipo convulsivo
Electroshock máximo Flurotil Estimulación audiogénica
Modelos de fenómeno epiléptico generalizado de tipo parcial
Pentilentertrazol bajas dosis Penicilina Aplicación de bicuculina Gama-hidroxitriptófano Estimulación subcortical
Modelos genéticos
Genético: fotosensible <i>Papio papio</i> Convulsiones audiogénicas en los ratones Rata con epilepsia genética Ratones transgénicos
Modelos animales de estatus epiléptico
Pilocarpina Ácido kaínico

Tabla 1. Clasificación de modelos de epilepsia *in vivo*. Se describe al kindling dentro del grupo de crisis parciales, sin embargo tiene la ventaja de llegar a generar CG características de los pacientes de difícil control (Modificada de Fisher, 1989).

II.7.1 *Kindling*

El modelo *kindling* amigdalino es un modelo experimental de epilepsia *in vivo*, de los más destacados, debido a que se inducen en un inicio crisis parciales producidas por la estimulación eléctrica amigdalina que posteriormente dan lugar a CG semejantes a las presentadas en los humanos, por lo que el modelo representa las crisis parciales complejas evolucionando a la crisis parciales secundariamente generalizadas, de mayor incidencia y complejidad en la población afectada con esta enfermedad (Goddard y cols., 1969; Fisher, 1989). Estas CG se presentan a causa de los cambios paroxísticos iniciales de despolarización en la neurona que responde a un potencial de acción de alta frecuencia, acompañado de una despolarización mantenida, seguida de una hiperpolarización que se propaga a estructuras subcorticales como el TM y la corteza del mismo hemisferio y/o del hemisferio contralateral, generalizando de esta forma la crisis (Armijo, 2008).

El *Kindling* amigdalino es descrito como un fenómeno causado por la aplicación repetida de un estímulo eléctrico, que da una intensificación progresiva de respuestas electrográficas (Figura 5) y conductuales hasta finalizar en crisis tónico-clónico generalizadas (CTCG) (Goddard y cols., 1969), ya que conforme se incrementa el número de estímulos también se incrementa la complejidad conductual y la duración de la PD. El desarrollo del comportamiento fue clasificado en cinco etapas progresivas y acumulativas. Etapa 1: movimientos facial, en uno o ambos ojos cerrados; fase 2: movimientos oscilatorios de la cabeza; etapa 3: movimientos mioclónicos de las extremidades anteriores; etapa 4: mioclónias en ambas extremidades; etapa 5: pérdida de la postura, caída y CTCG (Racine y cols., 1972). También se clasifica en crisis parciales y generalizadas (McNamara, 1984), además esta reportado que en este modelo eléctrico se observa una neurogénesis en el giro dentado de rata (Scott y cols., 1998); así como una proliferación de astrocitos en hipocampo, amígdala y corteza piriforme (Khurgel y Gwen, 1996).

Registro electrográfico del modelo de *kindling* en rata



Figura 5. Registro electrográfico del modelo de *kindling* en rata. De K₁ a K₅ se observan respuestas de crisis parciales, presentándose la alteración del registro solamente en la amígdala (AMG). El K₆ corresponde a una CTCG, siendo que la alteración electrográfica se presenta tanto en AMG como en la corteza (CTZ), además de que la duración es mayor.

Este modelo consta de estimulación eléctrica o química repetida, sobre varias estructuras del sistema límbico (amígdala, corteza e hipocampo) con el objetivo de incrementar la excitabilidad neuronal hasta provocar crisis epilépticas. La potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) es el mecanismo inicial del *kindling*, cuyo objetivo es que una descarga temporal de frecuencia repetitiva provoque un aumento mantenido de la respuesta sináptica (García y cols., 2010)

II.8 CEREBELO Y EPILEPSIA

Investigaciones evidencian la participación del CB en la epilepsia. En uno de estos trabajos se provocaron CTEG por la administración de pentilentetrazol y penicilina, registrando cambios en la frecuencia de descarga de células de la corteza cerebral y cerebelar (Dow y cols., 1962); utilizando estos modelos se demostró que dependiendo del parámetro de estimulación del CB se podía afectar la evolución del *kindling* (Guardiola y cols., 1977). Gatos cerebelectomizados presentan alteraciones de sueño, así como deficiencias motoras, histológicamente se observó degeneración del tronco cerebral, demostrado por el decremento en la densidad de células en estructuras conectadas con el CB, la OI y el NR (Paz y cols., 1982). La cerebelectomía total en el desarrollo de las crisis producidas por el modelo de *Kindling* amigdalino en gatos, resulta en un aumento de la duración de la PD y las espigas post-ictales, además de provocar cambios anatómicos y funcionales en estructuras del tallo cerebral principalmente NR y OI, propiciando la actividad epiléptica (Figura 6) (Paz y cols., 1985). En relación a los cambios neuroquímicos provocados por el procedimiento de cerebelectomía, se midieron los niveles de neurotransmisores en TM y corteza cerebral, encontrando una disminución de GLUT, aspartato y GABA en el TM a los 7 días de la cirugía y a los 15 días en la corteza. Sin embargo, a los 30 días se recobraron los niveles de estos aa, además de que glicina y taurina no presentaron modificaciones significativas (Cicirata y cols., 1991).

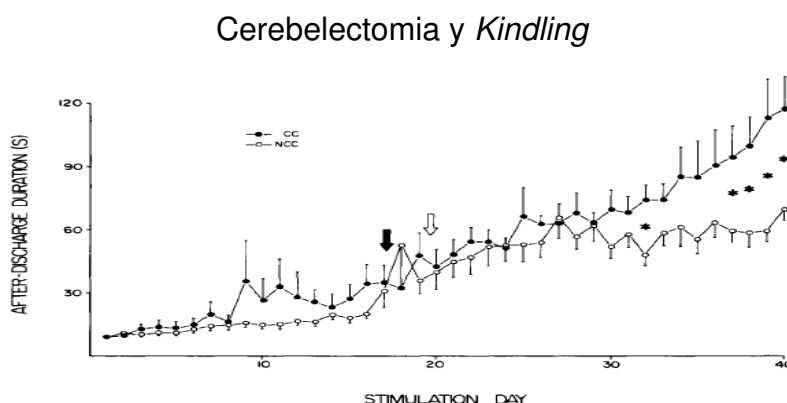


Figura 6. Cerebelectomía y *kindling*. Evolución temporal de la PD durante el procedimiento del *kindling*. GC = gatos cerebelectomizados; GNC = gatos no cerebelectomizados. La flecha negra indica el comienzo de las CG en los GC; La flecha blanca lo indica en los GNC. Los errores estándar se indican. Se consideraron promedios de cuatro gatos. El asterisco indica una significancia de $P < 0,05$, usando la prueba t de Students. (Tomada de Paz y cols., 1985).

Por otra parte, la lesión del PCS con degeneración retrograda del NI y núcleo fastigial, provoca decremento en el sueño (De Andres y Reinoso Suárez.,1979). La transección del PCS en el desarrollo del modelo de *kindling* en rata, provocó a los animales ataxia al andar, hipotonicidad en extremidades posteriores, además de que se requirió un mayor número de estímulos para alcanzar cada uno de los estados conductuales y la duración de las CTCG se acortaron, concluyendo que aunque el PCS no participa directamente el modelo epiléptico es probable que el procedimiento quirúrgico elimine vías de excitación sobre los circuitos envueltos en el proceso en *kindling* (Figura 7) (Paz y cols., 1991).

Transección del pedúnculo cerebelar superior: inicio y duración de las crisis generalizadas inducidas por *kindling* amigdalino.

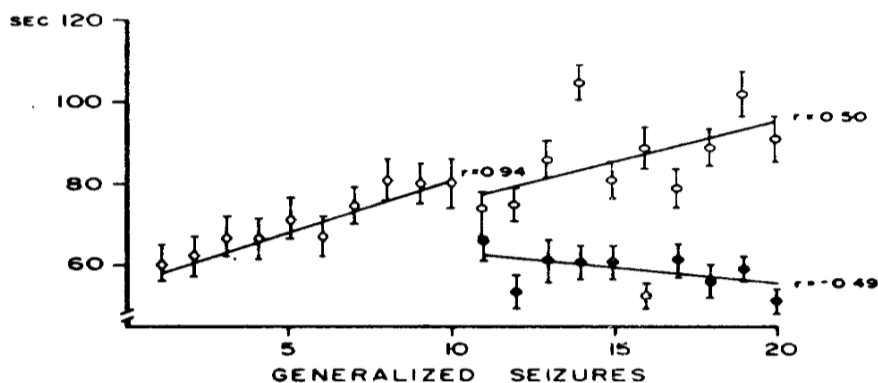


Figura 7. Transección del PCS. Se muestra los valores promedio obtenidos de la duración de las convulsiones en el *kindling* antes de la lesión cerebelar (rombos vacíos), después de la transección total del pedúnculo cerebelar superior ipsilateral a la amígdala estimulada (círculos rellenos), y después de la transección del lado contralateral (círculos vacíos). Se muestra la regresión lineal y su significancia. (Tomado de Paz y cols., 1991).

Con el objetivo de ver la participación de la principal vía de salida de información del CB en la actividad epiléptica se estimuló el PCS durante el desarrollo del *kindling* amigdalino, dando como resultados que los animales estimulados con 100Hz 20 μ A, requirieron un menor número de estímulos para llegar a cada uno de los estados conductuales y se redujo la duración de las CTCG (Figura 8) (Rubio y cols., 2004). Por otra parte la estimulación eléctrica del ND generó un decremento de la actividad epiléptica producida por la administración sistémica de penicilina en ratas (Culic., 1994).

Estimulación del pedúnculo cerebelar superior en las crisis generalizadas provocadas por el *kindling* amigdalino en ratas

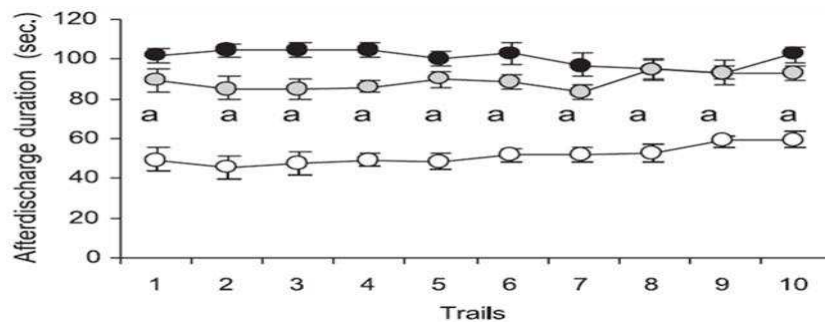


Figura 8. Estimulación del PCS en las CG. Diez consecutivas PD amigdalinas registradas durante la etapa 5 en el grupo control (círculos negros), ratas con un electrodo sobre el PCS sin estimulación (círculos grises) y ratas estimuladas con 20 uV a 100 Hz en el PCS izquierdo (círculos blancos). Se encontraron diferencias significativas usando la prueba de ANOVA ($p < 0,001$), aunque sólo el PCS estimulado mostró diferencias significativas entre grupos en la prueba de Tukey ($a = p < 0,01$) (Tomado de Rubio y cols., 2004).

Lesiones circunscritas de los ND y NI con AK previas al inicio de la estimulación amigdalina del modelo del *kindling* en rata, aceleraron el desarrollo de los estados conductuales, y disminuyeron la duración de las CG (Figura 9), además se observó histológicamente pérdida neuronal en ambos núcleos inyectados con AK. De acuerdo con los resultados probablemente el efecto del CB en la epilepsia promueve las respuestas motoras, primordialmente en las CG cuando están involucrados y afectados el TM y la CM (Rubio y cols., 2011).

Efectos de la lesión de núcleo dentado y núcleo Interpositus en el *kindling* amigdalino en ratas.

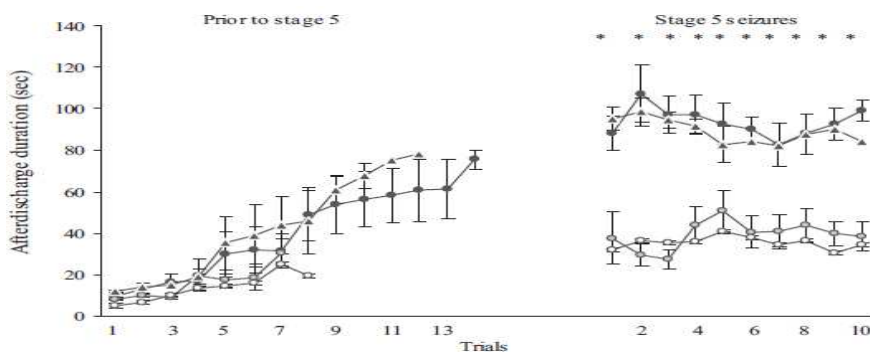


Figura 9. Duración de la PD amigdalina antes de la etapa 5 y durante 10 crisis posteriores. Grupo control (círculos negros), grupo estimulado (triángulos), grupo con lesiones en ND (círculos grises), y grupo con lesiones en NI (círculos blancos). Los valores se expresan en medias \pm S.E.M. La significación estadística se determinó por ANOVA de una vía, seguido de una pos prueba de Tukey * ($p < 0,01$) (Tomado de Rubio y cols., 2011).

II.9 ÁCIDO KAÍNICO

La excitotoxicidad es característica de enfermedades neurodegenerativas y trastornos en el SNC (Xiang-Yu y cols., 2011). Experimentalmente lesiones químicas con toxinas en diferentes estructuras cerebrales son empleadas como estrategia para la creación de modelos de excitotoxicidad como por ejemplo, el ácido quinolínico un metabolito derivado de la vía de las kinureninas que activa receptores de tipo NMDA del cuerpo estriado, conduce a daños que se asemejan a la enfermedad de Huntington (Pérez-Severiano y cols., 2008), así mismo las lesiones con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina en sustancia nigra son utilizadas para generar el modelo de Parkinson (Coyle y Schwarcz, 1976; Coyle y cols., 1978), además, la administración sistémica de AK es utilizada para generar un modelo de epilepsia (Kopeloff y cols., 1942), ya que el hipocampo es especialmente susceptible a los efectos del AK (Fisher y cols., 1984).

Originalmente el AK [ácido (2-carboxi-4-isopropenil-3-pirrolidinil)-acético] fue aislado de la alga marina "Kainin-Sou". Su fórmula molecular es $C_{10}H_{15}NO_4$ y su peso molecular es de 213.23 gr/mol. Fue utilizado como un compuesto antihelmíntico (Figura 10) (Xiang-Yu y cols., 2011).

Ácido kaínico

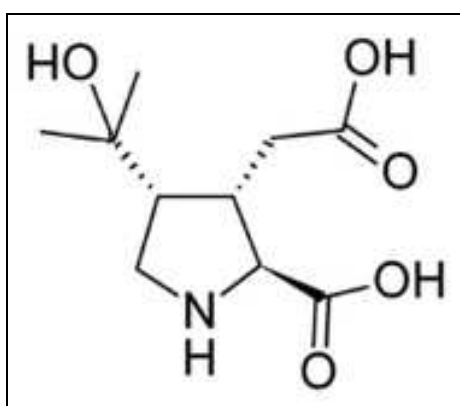


Figura 10: Estructura molecular de AK.

El AK además de utilizarse como modelo de epilepsia también se emplea para destruir grupos neuronales específicos del cerebro, debido a que es un análogo del GLUT y considerado como una molécula con una potente acción neurotóxica, con propiedades neuroexcitadoras 30 veces mayores que el GLUT (Ben-Ari, 1985; Xing y Zhu, 2011). El efecto excitatorio del AK fue descrito por primera vez en células neocorticales de rata y posteriormente se demostró su excitabilidad en neuronas motoras, talámicas y células piramidales del hipocampo de rata; dosis moderadas induce alteraciones electroencefalográficas y convulsiones similares a las crisis parciales complejas y en dosis altas provoca toxicidad celular (Fisher y cols., 1984), además de causar aumento en la peroxidación de lípidos y en la actividad sintasa de óxido nítrico, por lo que el óxido nítrico podría causar acumulación de especies reactivas de nitrógeno, que a su vez, alteraría la función mitocondrial y desencadena la apoptosis o necrosis (Wang y cols., 2005).

La familia de los receptores a kainato se divide en dos subfamilias las cuales incluyen los Glu5, Glu6, Glu7 y los KA1 y KA2 (Xiang-Yu y cols., 2011; Xing y zhu, 2011). La administración de AK activa los receptores de KA1 y KA2 y en concentraciones más altas a los receptores AMPA. Estos receptores de kainato se expresan ampliamente en todo el cerebro (hipocampo, la corteza, el TM y CB) de rata, así mismo en diferentes regiones del mismo hipocampo existiendo variación en la expresión de la subunidad los receptores, siendo la expresión de la subunidad KA1 la que mayormente se presenta en el área CA3 (Juha Järvela, 2011).

El mecanismo por el cual el AK es responsable de la muerte de las células neuronales es debido a la entrada excesiva de Ca^{++} intracelular propiciada por la sobreestimulación de los receptores KA1 (Hong y cols., 2010; Xing y zhu, 2011; Xiang-Yu y cols., 2011), lo que provoca la desintegración de la membrana del retículo endoplasmático, la generación de especies reactivas de oxígeno, la disfunción mitocondrial y finalmente a la apoptosis o necrosis (Zhang y Zhu, 2011; Wang y cols., 2005; Xiang-Yu y cols., 2011) (Figura 11); además de que también induce incremento en la activación de microglía y

astrocitos (Wang, y cols., 2005; Xing y zhu, 2011). Ésta toxicidad promueve la pérdida de grupos celulares primordialmente glutamatérgicos y aspartatérgicos (Czubayko y cols., 2001; Monaghan y cols., 1986). Además la administración localizada de AK produce muerte celular selectiva, sin producir daño en las fibras aferentes, eferentes o de paso (McGeer y cols., 1978).

Neurotoxicidad de AK

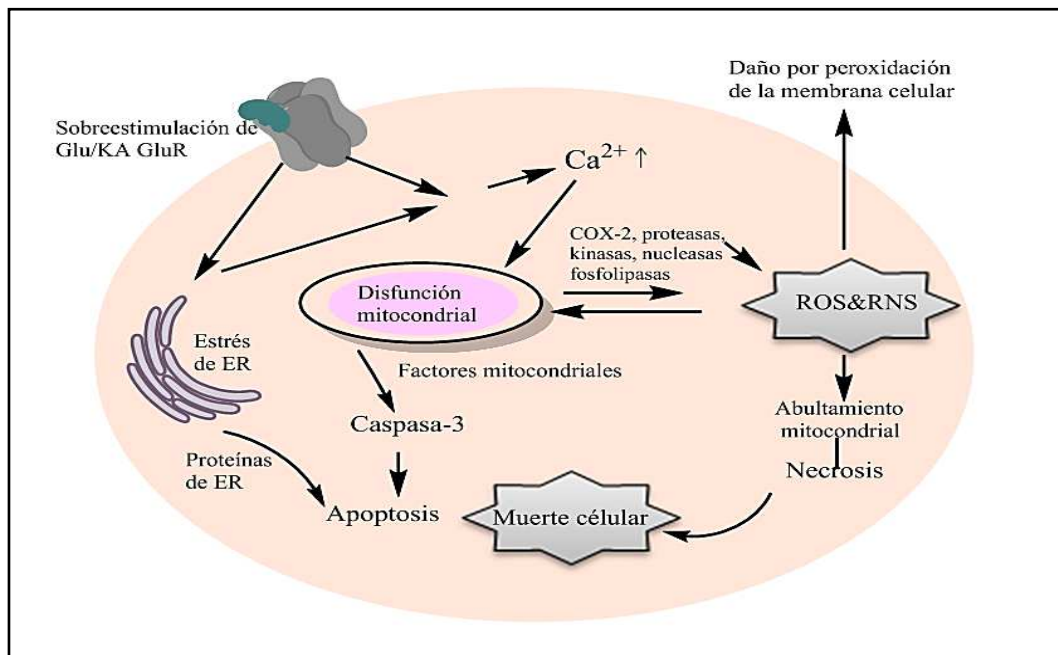


Figura 11. Neurotoxicidad de AK. El mecanismo de Neurotoxicidad causada por el AK debido a la entrada excesiva de Ca^{++} intracelular y la sobreestimulación de los receptores de glutamatérgicos kainato (K1,2), finalizando en la muerte neuronal. (Modificada de Xing y zhu., 2011).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente no existe una estrategia terapéutica exitosa para pacientes con epilepsia de difícil control. Lesiones experimentales con AK en el ND y NI han demostrado disminuir la duración de las CG inducidas en el modelo *kindling* amigdalino. Sin embargo, es necesario establecer el efecto de estas lesiones bilateralmente en este modelo de epilepsia, una vez que las ratas tengan establecidas las CTCG.

IV. HIPÓTESIS

Las lesiones en los núcleos dentado e interpositus con ácido kaínico previas a la estimulación amigdalina en ratas, disminuyen la duración de las crisis tónico clónico generalizadas del modelo *kindling*, entonces si se realizan lesiones bilateralmente en estos núcleos una vez establecidas las crisis generalizadas, esperaríamos abatir la actividad epiléptica del modelo *kindling*.

V. OBJETIVOS

V.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la lesión bilateral de los ND y NI con AK sobre la morfología cerebral y la respuesta electrográfica en el modelo de *kindling* amigdalino en rata.

V.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la duración de la respuesta electrográfica y conductual después de la lesión bilateral de los ND y NI en el modelo *kindling* amigdalino en rata.
- Evaluar el efecto citológico en el CB después de la lesión bilateral de los ND y NI en el modelo *kindling* amigdalino en rata.
- Cuantificar las concentraciones de GLUT y GABA en CB, NR, TM y CM, después de la lesión bilateral de los ND y NI en el modelo *kindling* amigdalino en rata.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Material biológico

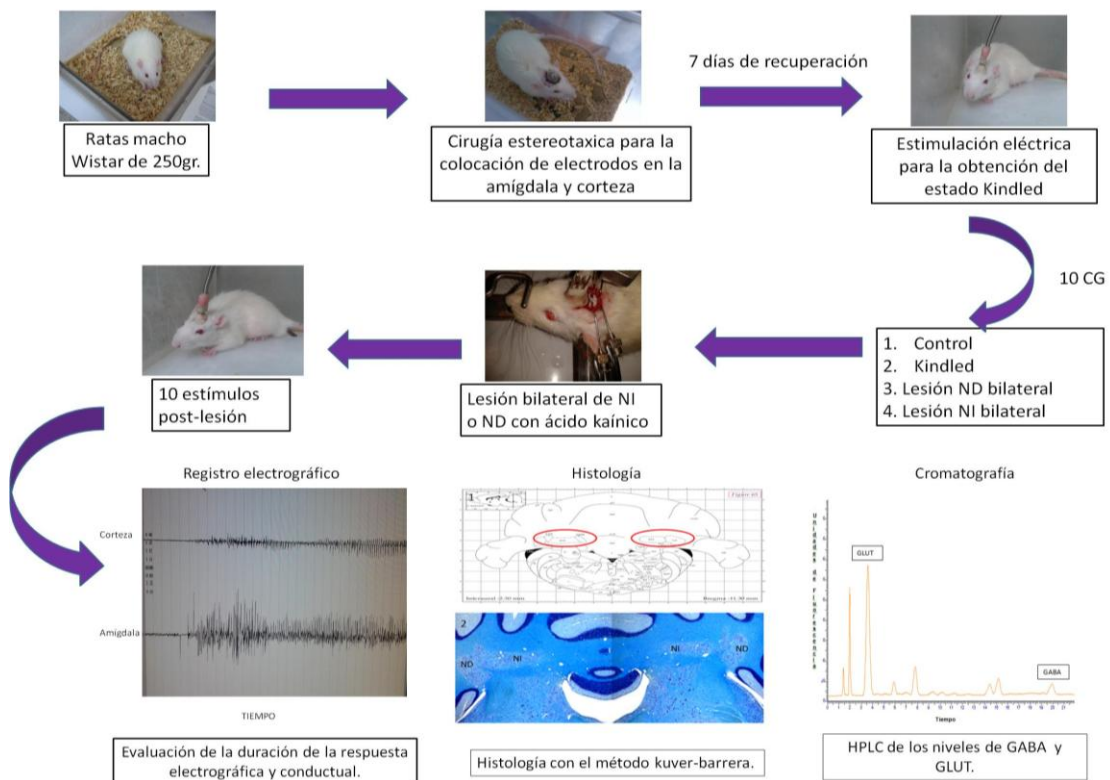
Se emplearon ratas macho (n=6 por grupo) de la cepa Wistar (250-300 gramos). Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones de aire, temperatura y humedad controladas y ciclos de luz-obscuridad de 12:12 horas, con libre acceso a comida y agua. Cada uno de ellos fueron tratados con las medidas necesarias para minimizar el dolor o sufrimiento de acuerdo a las regulaciones especificadas por el Comité de Uso y Cuidado Animal del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) "Manuel Velasco Suárez", los estándares de los Institutos Nacionales de Salud de México y la Norma Oficial Mexicana 062 (NOM-062).

VI.2 Cirugía

Las ratas fueron anestesiadas con zoletil 50® (30mg/Kg. i.m.) y colocadas en un aparato estereotáxico (David Köpf), para colocar electrodos bipolares utilizados en la estimulación y registro en el núcleo basolateral amigdalino (coordenadas anterior 6.2 mm, laterales de 5 mm, y altura de 1,5 mm) utilizando la línea interaural como punto de referencia, según el atlas de Paxinos y Watson de 1982. Otro electrodo se colocó en la CM para registrar la propagación de la PD a esta estructura. Cada electrodo consistió de un alambre aislado bipolar (0,005 pulgadas de diámetro), de acero inoxidable (A-M Systems) recubiertos de teflón excepto en las puntas. Un tornillo implantado en el cráneo, sirvió como una fuente de referencia (tierra). Los electrodos se unieron a un mini conector y se fijaron al cráneo con acrílico dental (Arias®). Se suturó la piel dejando el mini conector expuesto. Después de siete días de recuperación post-operatoria, las ratas fueron colocadas en una cámara de acrílico transparente (22.5x30x30 centímetros) para iniciar la estimulación eléctrica. El microconector se unió por medio de alambre flexible al estimulador Grass S88 y un sistema de adquisición y análisis de señales EB neuro con software ST Galileo.

Las ratas fueron estimuladas todos los días con 5 volts por 1.0 segundo de duración hasta obtener CTCG. Durante el *kindling* se midieron los siguientes parámetros: Duración de la PD amigdalina durante toda la evolución del modelo, y la progresión de los estados conductuales. Una vez que los animales presentaron 10 CTCG fueron nuevamente colocados en el aparato estereotáxico bajo las mismas condiciones de anestesia para realizar lesiones bilaterales en NI o en el ND, mismas que se llevaron a cabo por medio de una microinyección estereotáxica de 1.0 μ l de AK (Sigma Aldrich) en una concentración 5 μ M a una velocidad de flujo de 0.1 μ l/min. (coordenadas para ND: anterior 2.3 mm, laterales de 3.5 mm, altura 4.0 mm; y para NI: anterior 2.3 mm, laterales de 2.4 mm, altura 4.0 mm) utilizando la línea interaural como punto de referencia, según el atlas de Paxinos y Watson 1998.

VI.3 Diseño experimental



VI.4 Histología

Con la finalidad de corroborar que la lesión de los ND y NI estuviera circunscrita, se procedió a realizar la técnica histológica de *Kluver-Barrera*, tres ratas de cada grupo fueron profundamente anestesiadas con pentobarbital sódico (Pisabental 25mg/kg) y perfundidas intracardiamente, inyectando 1ml de heparina (Rimsa) en el ventrículo derecho. Inmediatamente después de 6 segundos se lavó el sistema vascular con buffer de fosfatos salino (PBS) (Sigma P4417) durante 30 segundos y se fijo este sistema con paraformaldehído (Sigma P6148) al 4% a 4 °C, los cerebros fueron removidos y almacenados durante 24 horas para una pos-fijación en paraformaldehído al 4%, posteriormente fueron crioprotectados con sacarosa (Sigma S9378) al 30% disuelta en PBS.

Los cerebros fueron incluidos en parafina (Golden Bell) y se realizaron cortes coronales seriados de 7 μ m del CB, 1mm anterior y 1mm posterior a la coordenada que fue ocupada para la lesión de los núcleos cerebelares (2.3mm), para abarcar por completo el área de los núcleos lesionados, los cortes fueron montados en laminillas tratadas previamente con silano y se realizó la desparafinación e hidratación correspondiente para realizar la técnica histológica de *Kluver-Barrera*, práctica que consiste en evidenciar fibras nerviosas en azul y cuerpos celulares en violeta. Las laminillas se observaron y se tomaron microfotografías con un microscopio Olympus (1X81F3).

VI.5 Cromatografía Líquida de Alta Resolución

- Preparación de muestras.

Tres ratas de cada grupo fueron administradas con un inhibidor de la GAD, el ácido 3-mercaptopropiónico (Sigma Aldrich) (1.2 mmol/kg i.v.) para inhibir el incremento de GABA *post mortem*. Dos minutos después, los animales se sacrificaron por decapitación y se realizó la disección de la CM, CB, NR y TM en frío. Los tejidos de rata se homogenizaron en 20 volúmenes de metanol (High Purity) agua (Milli-Q Water System, Millipore, Bedford, MA) (85% v/v), se centrifugaron a 15,000 rpm durante 20 min, las alícuotas del sobrenadante se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Los tejidos destinados para medir el porcentaje de recobro, se le añadieron los aa estándares al momento de homogenizar el tejido.

- Condiciones cromatográficas.

Los niveles de las concentraciones de los aa (GLUT y GABA) se cuantificaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés) con detección por fluorescencia el cual consistió en un sistema cromatográfico con una bomba binaria (PerkinElmer series 200), la cual estaba conectada a un desgasificador en línea (PerkinElmer Series 200 Vacuum Degaser). Para la reacción de derivatización, se adicionaron 100 μL del reactivo orto-ftaldehído (OPA) (Sigma Aldrich) a 100 μL de los estándares y de muestra de CM, CB, NR y TM, se inyectaron 20 μL de la mezcla al cromatógrafo. La separación de GLUT y GABA se realizó mediante una columna OPA-HR, la fase móvil compuesta por dos fases fue: "A" (solución 50 mM de acetato de sodio (pH 5.9), conteniendo 1.5% v/v de tetrahidrofurano (Sigma 27038) y la fase móvil "B" (metanol grado HPLC (Hycel 912), en un gradiente lineal que va desde un 10% hasta un 30% de la fase B. La cuantificación se realizó por medio de un detector de fluorescencia con una longitud de onda de 344 nm de excitación y 455 de emisión. (Pérez-Neri y cols., 2004; Pérez-Neri y cols., 2007).

Validación parcial de estándares de aa.

(NOM-177-SSA1-1998; Guidance for industry, 2001).

- Selectividad.

Para observar la capacidad de selectividad de nuestro método para cuantificar exacta y específicamente GABA y GLUT a una concentración de 1.2 μM , en presencia de otros aa (aspartato, citrulina, arginina, taurina glicina y glutamina), y demostrar que no hay interferencias, se analizó una solución estándar a la cual se le añadieron los 8 aa antes mencionados.

- Linealidad del método.

Se evaluó a partir de una curva de calibración de GABA y GLUT en el intervalo de concentraciones de 0.1 a 1.5 μM por triplicado. Se graficó el área bajo la curva (ABC) con respecto a la concentración de cada aa y por medio de un ajuste de mínimos cuadrados se determinó la ordenada al origen (b), la pendiente (m), y el coeficiente de regresión. El método se consideró lineal si el coeficiente de regresión fue mayor o igual a 0.99.

- Precisión.

La precisión se determina mediante la repetibilidad. Se analizó en un solo día por cuadruplicado soluciones stock de GABA y GLUT a concentraciones baja, media y alta (0.2, 0.7 y 1.4 μM). Las concentraciones utilizadas fueron diferentes a las manejadas en la curva de linealidad, pero incluidas en el rango de 0.1 a 1.5 μM . El porcentaje del coeficiente de variación (%CV) no debe ser superior al 15% y se obtuvo con la fórmula: [Desviación estándar de la concentración encontrada / la media de la concentraciones encontrada] * 100.

- Exactitud.

Para evaluar la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente (concentración encontrada) y el valor de referencia (concentración nominal) se realizó una prueba t con n-1 grados de libertad y con $\alpha = 0.05$. (3.182, n=4). El método se considera exacto si la t calculada es menor a la t de tablas (Wayne, 2011). Además, para corroborar también la exactitud se obtiene el porcentaje de recobro (%RE) de los datos previamente obtenidos en la evaluación de la repetibilidad, en donde el %RE (concentración nominal - concentración encontrada)/ concentración nominal *100) debe de estar dentro del rango +/- 15% para cada concentración.

Validación parcial de aa en tejido de rata.

(NOM-177-SSA1-1998; Guidance for industry, 2001).

- Selectividad.

Para observar la capacidad de selectividad de nuestro método para cuantificar exacta y específicamente GABA y GLUT, y demostrar que no hay interferencias con otros aa contenidos en el las estructuras cerebrales, se analizaron las muestra de tejido de rata de cada estructura.

- Determinación de concentraciones basales de aa en rata.

Se realizó una curva de calibración con aa estándares a concentración de 0.1 a 1.5 μM . Posteriormente se analizaron muestras de CB, NR, TM, CM por triplicado y se extrapolaron en la curva para calcular sus concentraciones basales.

- Niveles de GABA y GLUT en tejido de rata con adición de estándar.

Se realizó una curva de calibración con aa estándares a concentración de 0.1 a 1.5 μM . Una vez encontradas las concentraciones basales de aa, se añadió

una cantidad conocida de GLUT y GABA a las estructuras CB, NR, TM y CM (muestras con adición estándar), para evaluar el porcentaje de recuperación de aa (%RC), el cual se obtiene con la fórmula: $[\text{concentración obtenida} / \text{concentración teórica}] * 100$. El %RC debe estar dentro del rango de 85-115 %.

Concentración obtenida= Concentración obtenida experimentalmente de aa, expresada en nm/mg de tejido en las muestras con adición de estándar.

Concentración teórica= Concentración expresada en nm/mg de tejido en las muestras basales + cantidad de aa añadida.

- Concentraciones de GABA y GLUT en grupos experimentales.

Se realizó una curva de calibración con aa estándares en concentración de 0.1 a 1.5 μM . Posteriormente se midieron las muestras de las estructuras CB, NR, TM y CM de tres ratas por grupo y se analizaron las concentraciones de los aa GABA y GLUT.

VI.6 Análisis estadístico

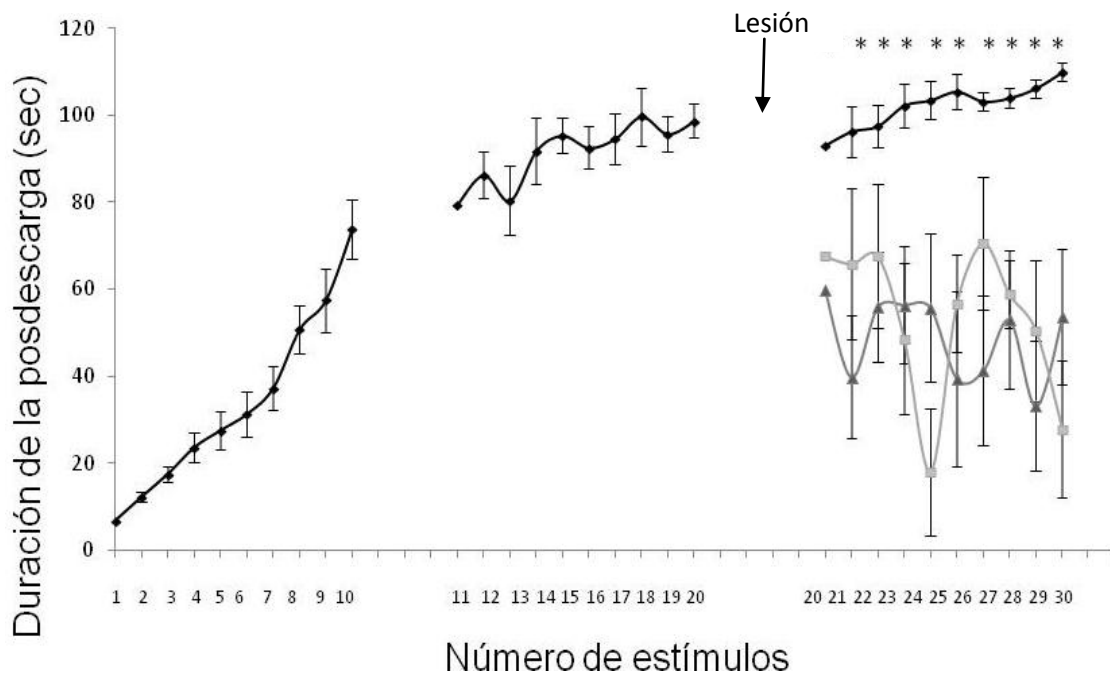
Los resultados electrográficos y de cromatografía son expresados como la media \pm error estándar en cada grupo, a los cuales se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía de medidas repetidas, seguido de una prueba de comparación múltiple de *Tukey*. En el caso del análisis de los estados conductuales se realizó una prueba de *Fridman*. Para todas estas pruebas se considero un punto de corte para el nivel de significancia de $p < 0,05$ (*). Para las pruebas de validación parcial se utilizaron los cálculos estadísticos señalados en la NOM-177-SSA1-1998.

VII. RESULTADOS

VII.1 Registros electrográficos y estados conductuales

Para cumplir con los objetivos propuestos, se desarrollo el modelo *kindling* en veinticuatro ratas, las cuales se agruparon en los diferentes grupos (Grupo I con ratas control "Control"; Grupo II con ratas en estado *kindling* "Kindled"; Grupo III ratas con estado *kindling* mas lesión en el ND "ND"; y el grupo IV ratas *kindling* mas lesión en el NI "NI". Como se describe en los métodos, todos los animales fueron registrados en el número de estímulos necesarios para alcanzar cada uno de los estados conductuales, así como el estado kindled y el tiempo de la duración de la actividad epiléptica. El estado kindled se definió a partir del primer estado conductual 5 en la escala de Racine, a partir de este dato también se realizaron los registros para el establecimiento del modelo (10 CTCG), y la posterior lesión de los grupos ND y NI.

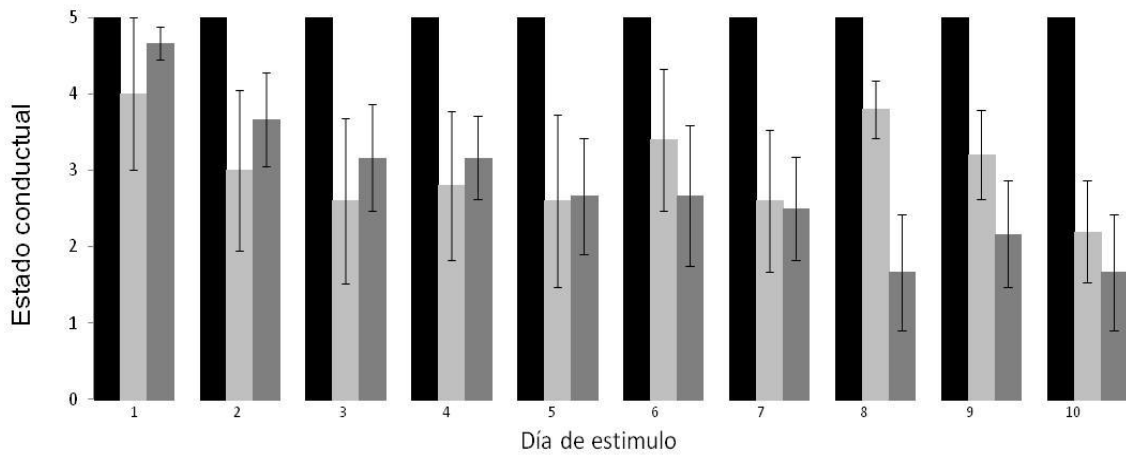
En la Gráfica 1 se muestran los resultados de la evolución del modelo y el aumento en el tiempo de duración de la actividad epiléptica acordes a lo establecido por Paz y cols., obtenido el estado 5 en los 10 ± 3 estímulos, con un tiempo de duración de de la crisis de 90 ± 15 segundos (Paz y cols., 1991). Posterior a establecer el estado kindled, se realizo el registro de 10 CTCG, las cuales se presentan en el 20 ± 2 estímulos, en este punto de corte, los animales experimentales (ND y NI) fueron lesionados con AK, posterior a la lesión los grupos de ND y NI presentaron una reducción en el tiempo de duración de la actividad epiléptica estadísticamente significativa (entre 60 ± 5 segundos y 40 ± 5 para el grupo de ND y entre 50 ± 5 segundos y 30 ± 5 para el grupo del NI) (Grafica 1) a lo largo de las siguiente 10 ± 3 estímulos .



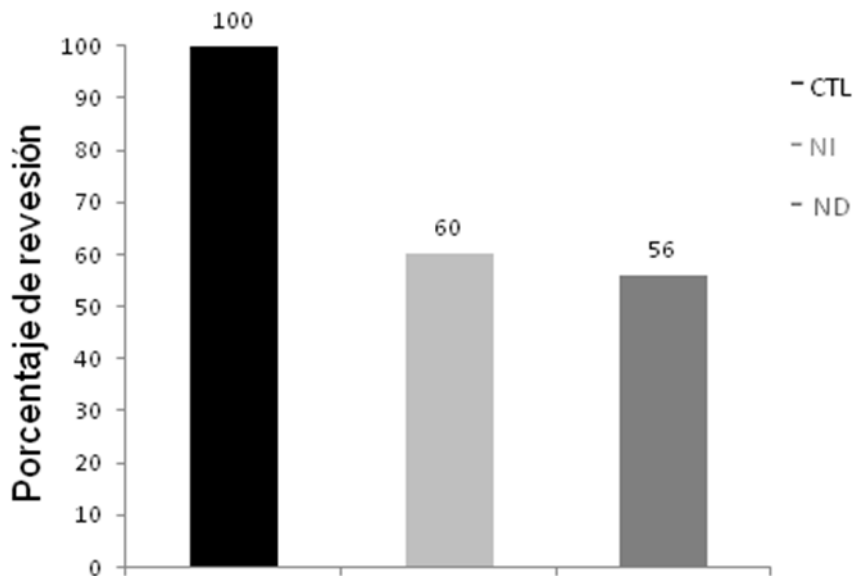
Gráfica 1. Desarrollo, establecimiento del modelo y respuesta post-lesión del modelo *kindlig* amigdalino. Desarrollo del modelo *kindling* (estímulos 1 al 10); establecimiento del modelo (estímulos del 11 al 20); respuesta de los grupos *kindling*, ND y NI (estímulos del 21 al 30). Grupo *kindling* (rombos negros), grupo con lesión bilateral de ND (triángulo gris) y grupo con lesión bilateral de NI (cuadro gris). ANOVA de medidas repetidas seguido de *Tukey*. $p < 0.05$. (*). $n = 6$.

En la gráfica 2 se presenta el registro de los estados conductuales posterior a la lesión de los ND o NI, se observa disminución a partir del primer estímulo y a lo largo de los 10 estímulos posteriores (la reversión se presenta desde un solo estado hasta no presentar ninguna alteración en ambos grupos).

Con la finalidad de observar la reversión de los estados conductuales, se realizó el análisis porcentual de los estados conductuales. En la Gráfica 3 se observa una reversión del 56 % en el grupo con lesión en el NI y de un 60 % en el grupo con lesión en el ND.



Gráfica 2. Estados conductuales post-lesión. Grupo control (barras negras), grupo con lesión bilateral de ND (barras gris oscuro) y grupo con lesión bilateral de NI (cuadro gris claro). Los grupos con lesión en el ND y NI presentaron una reversión en los estados conductuales en los comparados con el grupo control. Se presentan las medias \pm e.e. n=6 en cada grupo. Prueba de *Fredman*.



Gráfica 3. Promedio de reversión de los estados conductuales post-lesión. Grupo control (barras negras), grupo con lesión bilateral de ND (barras gris oscuro) y grupo con lesión bilateral de NI (cuadro gris claro). Se observa que hay una mayor reducción de los estados conductuales en el grupo ND.

Las ratas lesionadas con AK en ND y NI mostraron pérdida de tono muscular y dificultad al andar en las extremidades posteriores después de 3 días siguientes de la cirugía, recuperándose antes de los 10 días post-lesión. Para descartar que el AK se difundiera a otras estructuras, se tomó un registro electrográfico basal previo a la continuación de la estimulación post-lesión, sin encontrar ninguna alteración.

VII.2 Histología

Después de analizar las laminillas de las ratas del grupo control, se pudo identificar preservados a los ND y NI en ambos hemisferios del CB. En la figura (12.1) se muestra un esquema coronal tomado del atlas Paxinos y Watson (1982), de la coordenada utilizada para la lesión, resaltando con rojo la localización de ambos núcleos. En la figura (12.2) por medio de la técnica de *Kluver Barrera* se observa a los dos núcleos profundos cerebelares, en una composición de microfotografías de ambos hemisferios representativa de una de las ratas del grupo control.

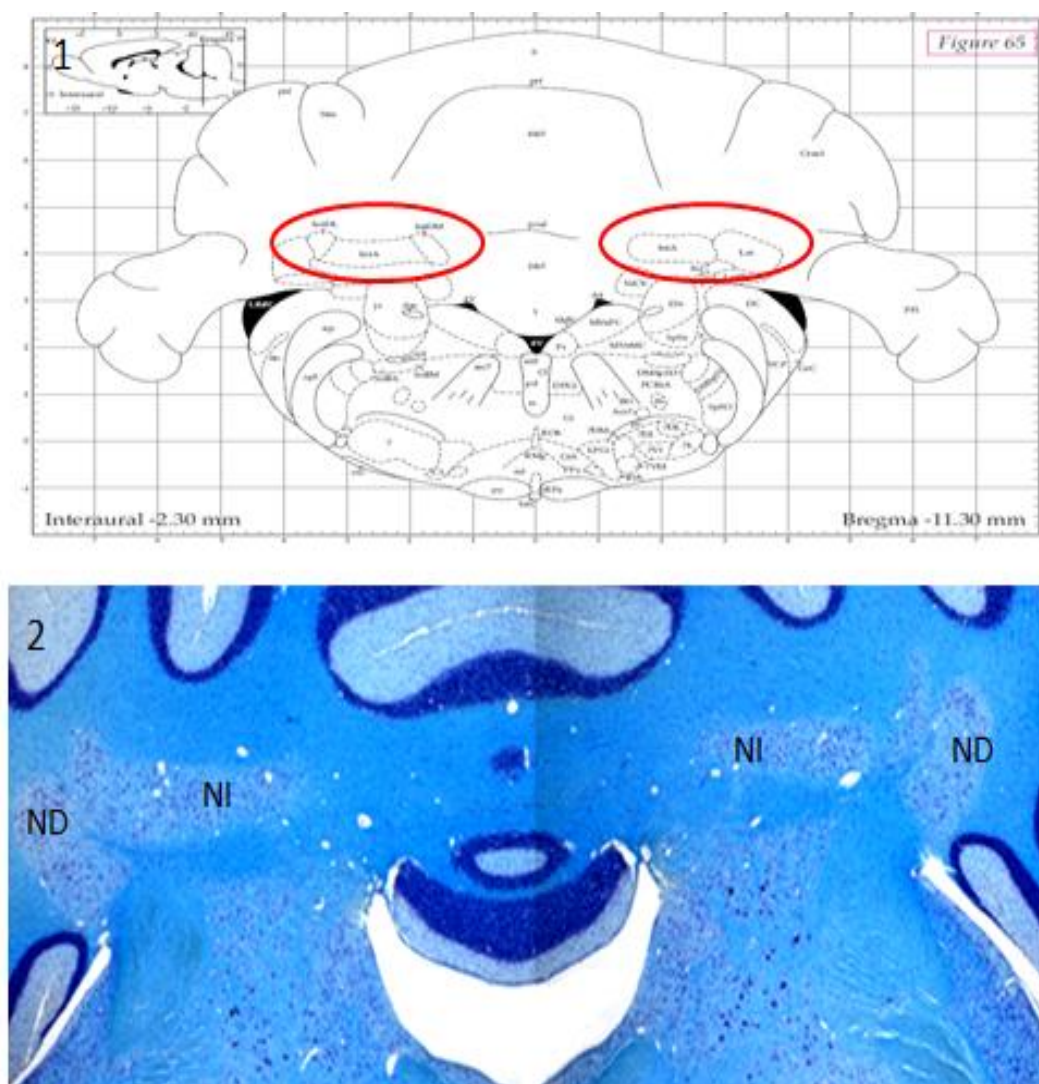


Figura 12. Esquema de CB e identificación de ND y NI. IntA = NI. Lat = ND. Se observa los ND y NI en ambos hemisferios del CB de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson 1998. (1). Microfotografías 2X de corte coronal de CB de rata control (2). Tinción con el método *Kluver-barrera*.

Al hacer la evaluación de las condiciones celulares en las que se encontraban los grupos con lesión en el ND y NI, se pudo observar que las células características de estos núcleos presentaban una hiperpigmentación (Figura 13 B y D), que impide observar la morfología intacta distintiva de estas células, como se puede apreciar en la figura 13 A y C del grupo control.

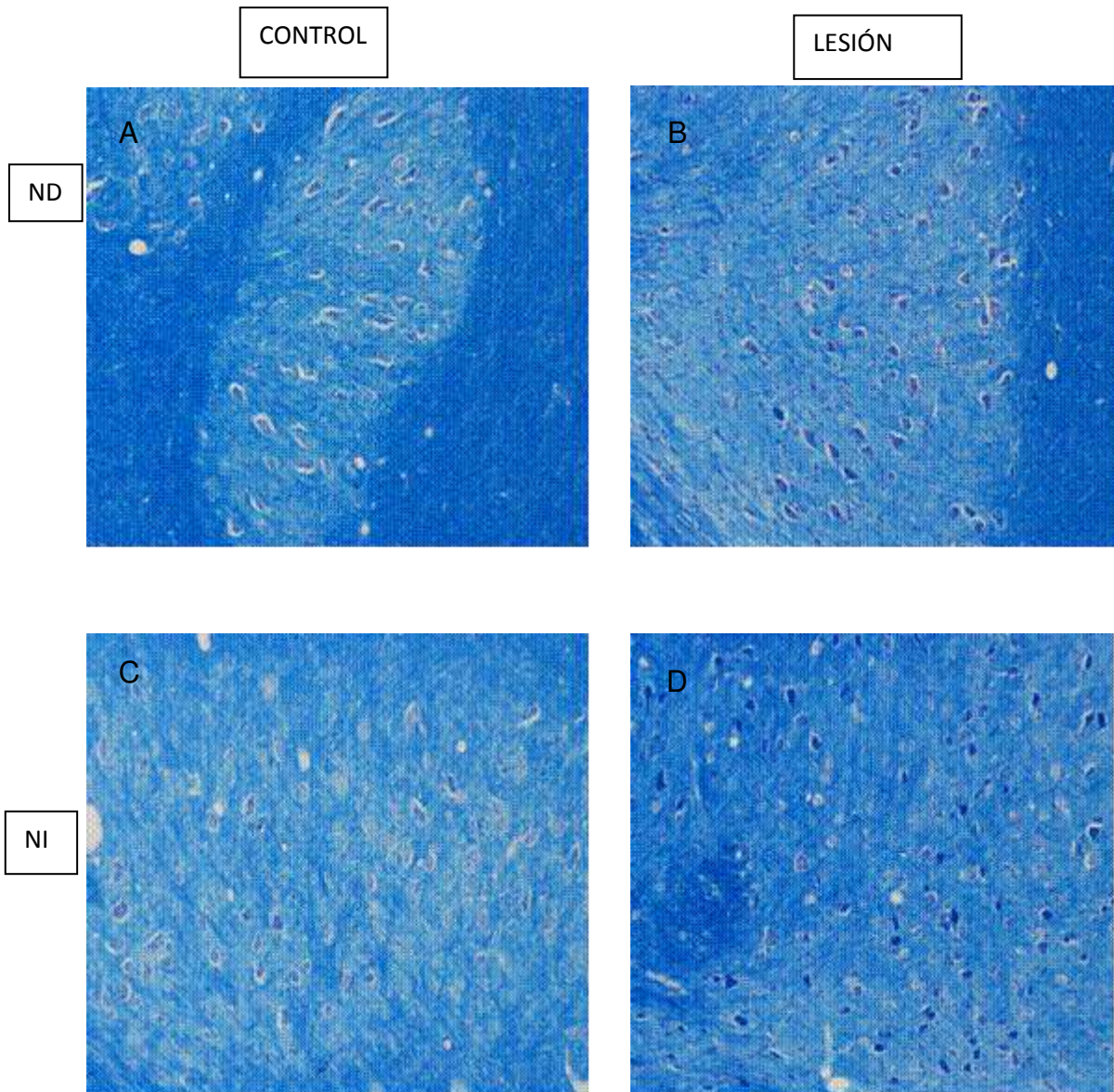


Figura 13. Evaluación histológica. Microfotografía 40X. Sección coronal de ND control (A), ND lesionado con AK (B), NI control (C) y NI lesionado con AK (D). Tinción con el método *kluver barrera*.

VII.3 Cromatografía líquida de alta resolución

Validación parcial de estándares de aa.

- Selectividad.

El método se consideró selectivo debido a que las señales de GABA y GLUT fueron plenamente reconocibles y no tuvieron ninguna interferencia con los aa aspartato, citrulina, arginina, taurina glicina o glutamina; además de que todas las señales del cromatograma fueron simétricas y se encontraron dentro de los rangos de límite inferior y exterior (Figura 14).

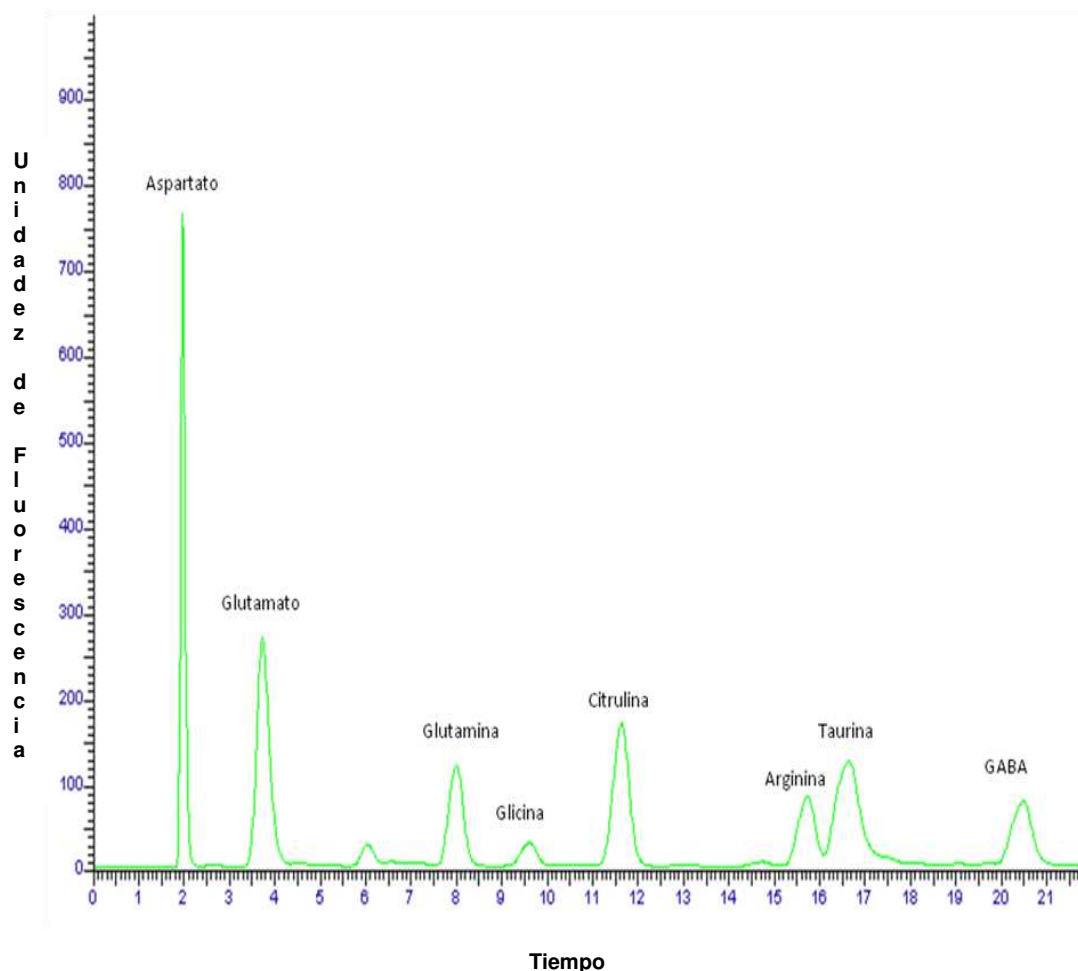


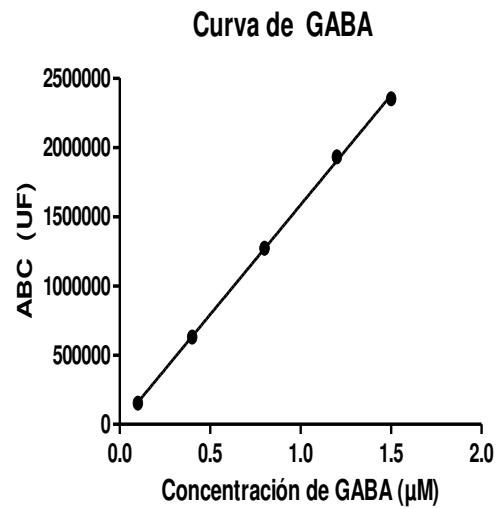
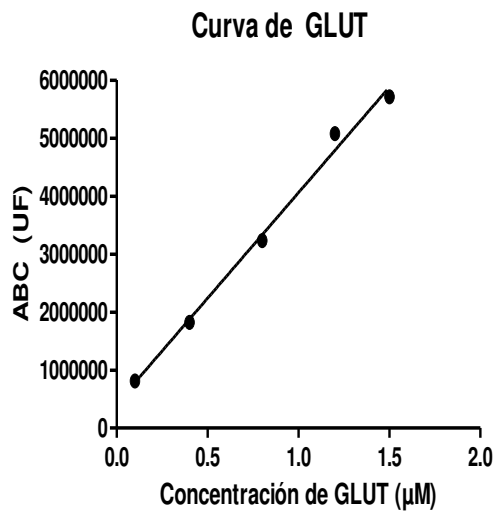
Figura 14. Cromatograma de aa estándar. En la selectividad, los tiempos de retención de los 8 aa fueron: Aspartato = 2 min; GLUT = 3.7 min; glutamina = 8; glicina = 9.5; citrulina = 11.5; arginina = 15.7; taurina = 16.7 y GABA = 20.5,

- Linealidad del método, con aa estándares.

Los resultados de linealidad se consideran aceptables ya que las tres curvas de calibración realizadas a concentraciones de 0.1, 0.4; 0.8, 1.2 y 1.5 μM , para los aa estándares de GABA y GLUT, fueron lineales al obtener el coeficientes de regresión para GLUT de $R = 0,998$ y para GABA de $R = 0.995$. Tabla 2 y Gráfica 4.

Concentración de GLUT (μM)	ABC (unidades de Fluorescencia)	Promedio de ABC	Concentración de GABA (μM)	ABC (unidades de Fluorescencia)	Promedios ABC
0.1	827037.83		0.1	159201.35	
0.1	832562.43		0.1	127722.2	
0.1	783611.13	814403.797	0.1	147779.71	144901.087
0.4	1804270.33		0.4	791596.98	
0.4	1571536.46		0.4	637684.5	
0.4	1845378.9	1740395.23	0.4	606576.02	678619.167
0.8	3243786.59		0.8	1289767.03	
0.8	3289383.43		0.8	1283259.67	
0.8	3167836.8	3233668.94	0.8	1243771.06	1272265.92
1.2	5001538.85		1.2	2191804.26	
1.2	4420238.4		1.2	1980707.64	
1.2	5140488.84	4854088.7	1.2	1960287.41	2044266.44
1.5	5752954.78		1.5	2594669.17	
1.5	5530442.63		1.5	2271278.68	
1.5	5855174.59	5712857.33	1.5	2205351.45	2357099.77

Tabla 2. Linealidad de concentración de GABA y GLUT. Promedio de los valores obtenidos al analizar GABA y GLUT en 5 concentraciones diferentes. De las tres curvas realizadas el mismo día, se obtuvo el promedio, el cual se requeriría para obtener el coeficientes de regresión que debe ser superior de 0.99.



Gráfica 4. Curvas de calibración para GLUT y GABA. Las gráficas se realizaron con el promedio del ABC de las tres curvas realizadas, para GLUT el resultado del coeficientes de regresión fue de $R = 0,998$ y para GABA $R = 0.995$. (UF) = Unidades de Fluorescencia; (ABC) = Área bajo la curva.

- Repetibilidad (Precisión).

La evaluación de aa estándares GABA y GLUT a concentraciones (Baja, media y alta (0.2, 0.8 y 1.4 μM) por cuadruplicado un mismo día, dio como resultado que el método es preciso ya que ambos aa está dentro del rango del %CV correspondiente a +/-15% (Tabla 3).

Concentración nominal de GLUT (μM)	Concentración encontrada μM	%CV
0.2	0.171593176	5.10178165
0.2	0.186469563	
0.2	0.192420404	
0.2	0.177345034	
0.7	0.638384798	5.24979081
0.7	0.654734605	
0.7	0.718849522	
0.7	0.660734788	
1.4	1.455596953	3.83790955
1.4	1.347381304	
1.4	1.459344316	
1.4	1.456268624	

Tabla 3. Repetitividad del método. Promedio de los valores obtenidos al analizar GABA y GLUT en 3 concentraciones diferentes por cuadruplicado en el mismo día.

- Exactitud.

El método se considera exacto debido a que el %RE se encuentra dentro del rango +/- 15% en cada una de las concentraciones evaluadas (Tabla 4).

Concentración nominal de GLUT (μM)	Concentración encontrada	% RE
0.2	0.171593176	14.20341199
0.2	0.186469563	6.765218699
0.2	0.192420404	3.789798156
0.2	0.177345034	11.32748283
0.7	0.638384798	8.802171707
0.7	0.654734605	6.466485019
0.7	0.718849522	-2.692788819
0.7	0.660734788	5.609315945
1.4	1.455596953	-3.97121093
1.4	1.347381304	3.758478303
1.4	1.459344316	-4.238879725
1.4	1.456268624	-4.019187438

Tabla 4. Exactitud del método. La exactitud reportada con los datos de %RE, se obtuvieron de la fórmula: $(\text{concentración nominal} - \text{concentración encontrada}) / \text{concentración nominal} * 100$, obteniendo resultados dentro del rango +/- 15% para cada concentración.

Los resultados de la prueba de t para exactitud también muestran que el método es exacto para todas las concentraciones de los aa GABA y GLUT (Tabla 5 y 6).

Concentración nominal de GLUT (μM)	0.2	0.7	1.4
Replica	Concentración experimental (μM)		
1	0.16	0.62	1.43
2	0.18	0.64	1.32
3	0.18	0.70	1.43
4	0.17	0.65	1.43
Promedio	0.17	0.65	1.41
D.E	0.01	0.03	0.05
%CV	5.31	5.31	3.86
t calculada	-6	-3.33	0.4
t tablas	3.18	3.18	3.18

Tabla 5. Prueba de t para exactitud de GLUT. Se muestran los resultados de la prueba de repetibilidad para 3 concentraciones de GLUT por cuadruplicado.

Concentración nominal de GABA (μM)	0.2	0.7	1.4
Replica	Concentración experimental (μM)		
1	0.20	0.68	1.35
2	0.20	0.72	1.26
3	0.18	0.73	1.38
4	0.20	0.69	1.22
Promedio	0.20	0.71	1.30
D.E	0.01	0.02	0.08
%CV	4.82	3.39	5.84
t calculada	0	1	-2.5
t tablas	3.18	3.18	3.18

Tabla 6. Prueba de t para exactitud de GABA. Se muestran los resultados de la prueba de repetibilidad para 3 concentraciones de GABA por cuadruplicado.

Prueba de Hipótesis.

H_0 : $x = \mu$, el método es exacto

H_a : $x \neq \mu$, el método no es exacto.

Toma de decisión

Se acepta la H_0 si t calculada $< t$ tablas,

al 95% con $n-1$ grados de libertad.

Validación parcial de aa en tejido de rata.

- Selectividad.

El método se considero selectivo debido a que las señales de los aa de nuestro interés GABA y GLUT, en tejido cerebral de rata, fueron plenamente reconocibles y no tuvieron ninguna interferencia con otros aa. Además de que los tiempos de retención son similares a obtenidos con los aa estándar (Figura 15).

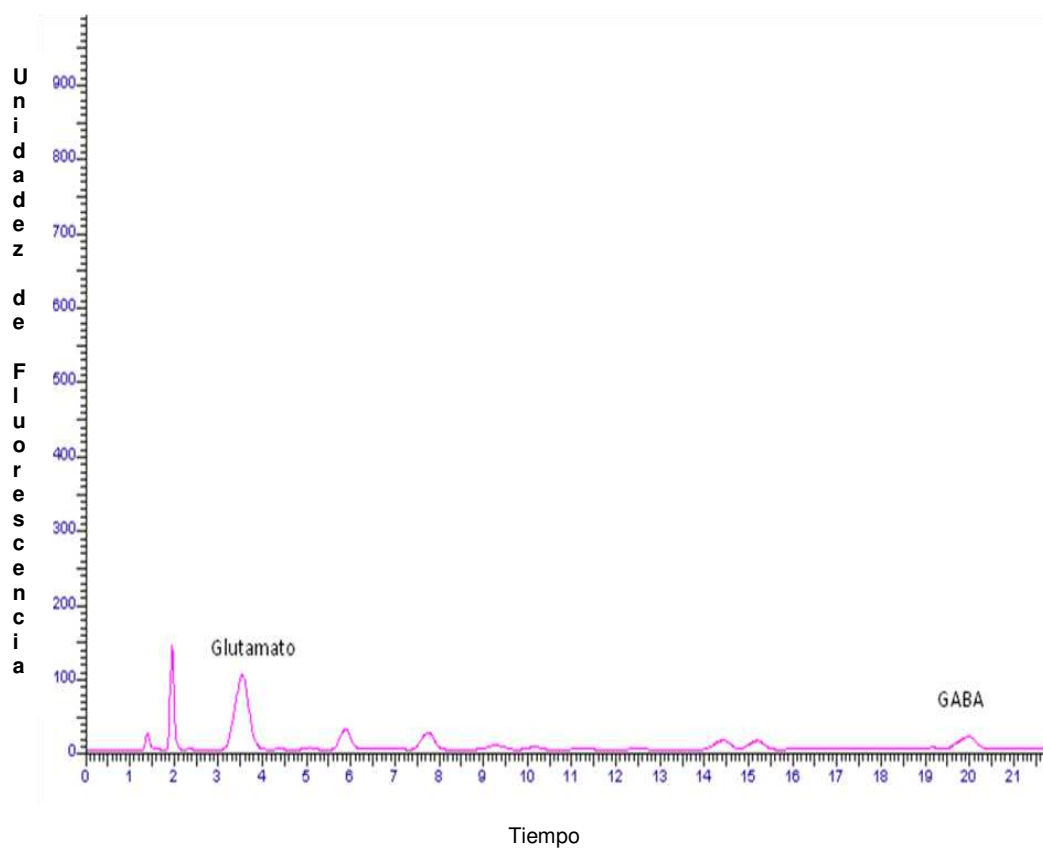


Figura 15. Cromatograma de aa en tejido de rata. Selectividad de los tiempos de retención en los aa de nuestro interés GABA y GLUT, en tejido cerebral de rata. GLUT = 3.7 min y GABA = 20.5 min.

- Niveles basales de GABA y GLUT y con adición estándar.

Se determinaron correctamente la identificación (Figura 16) y las concentraciones basales de GABA y GLUT en tejido de rata. Además la cuantificación del porcentaje de recobro (%RC) de estos aa con adición de estándar fueron satisfactorios ya que se cumplió con el rango establecido de $\pm 15\%$ (Tabla 7).

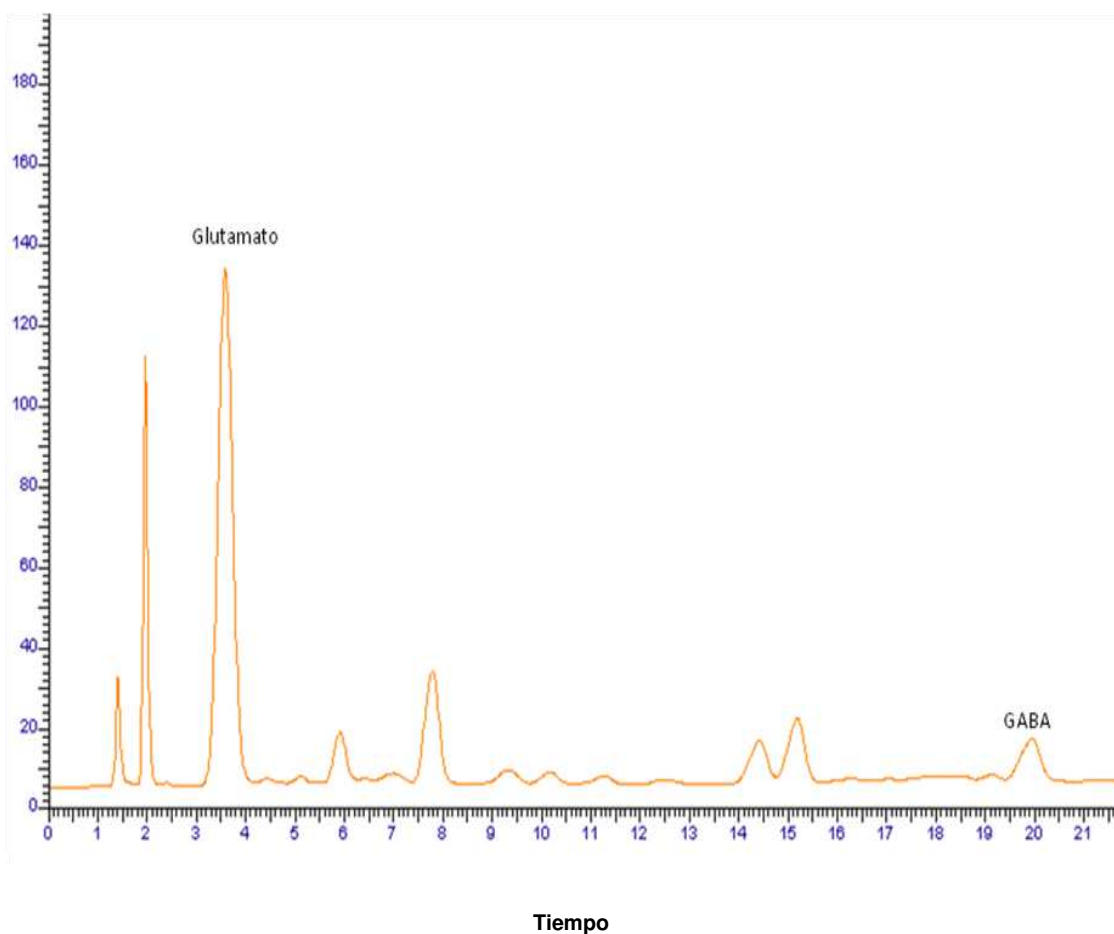


Figura 16. Cromatograma de la selectividad de los tiempos de retención de GABA y GLUT, en tejido cerebral de rata. Se observa que el tiempo de retención de GLUT es aproximadamente en 3.7 minutos, mientras en el GABA es de 20.5 minutos.

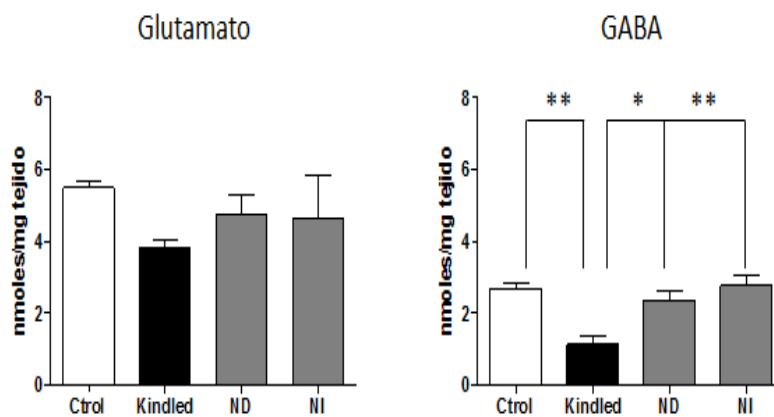
Niveles basales de GABA y GLUT en tejido de rata				
aa	Estructura	Concentración(nmoles/mg de tejido)	Concentración teorica (nmoles/mg de tejido)	Observación
GLUT	NR	5.5	6.5	Niveles basales de GABA y GLUT. Se presentan los resultados del promedio de los tres ratas por cada una de las estructuras en concentraciones expresadas en nmoles/mg de tejido
	CB	10.54	11.54	
	TM	7.44	8.44	
	CM	9.75	10.75	
GABA	NR	2.68	4.68	
	CB	1.28	3.28	
	TM	3.25	5.25	
	CM	1.41	3.41	

Niveles de GABA y GLUT en muestras con adición de estándar				
aa	Estructura	Concentración(nmoles/mg de tejido)	%RC	Observación
GLUT	NR	6.26	96.3	El %RC se obtuvo con la fórmula: (concentración de tejido con adición*100/concentración de tejido teórico)
	CB	10.18	88.25	
	TM	8.12	96.18	
	CM	11.93	110.9	
GABA	NR	4.02	85.6	
	CB	3.1	94.5	
	TM	4.74	90.28	
	CM	3.26	95.66	

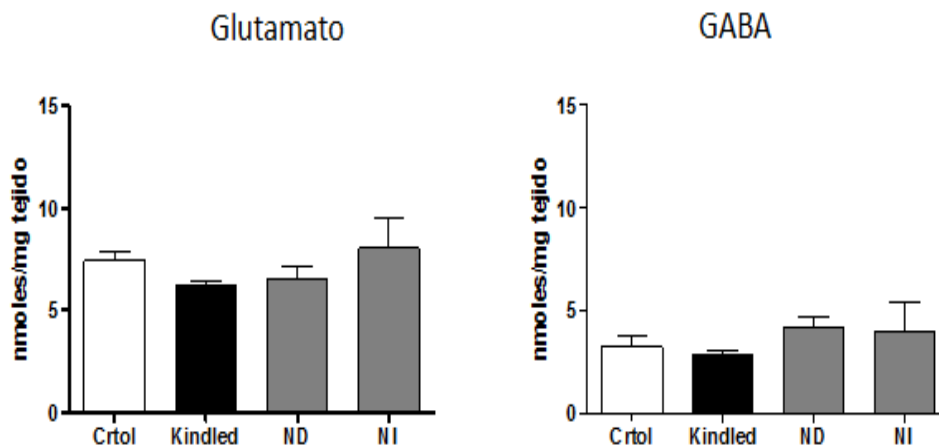
Tabla 7. Niveles basales de GABA y GLUT y con adición estándar. La concentración teórica se obtuvo sumando una unidad a los valores basales de GLUT y 2 unidades a los valores basales de GABA.

Concentraciones de GABA y GLUT en grupos experimentales.

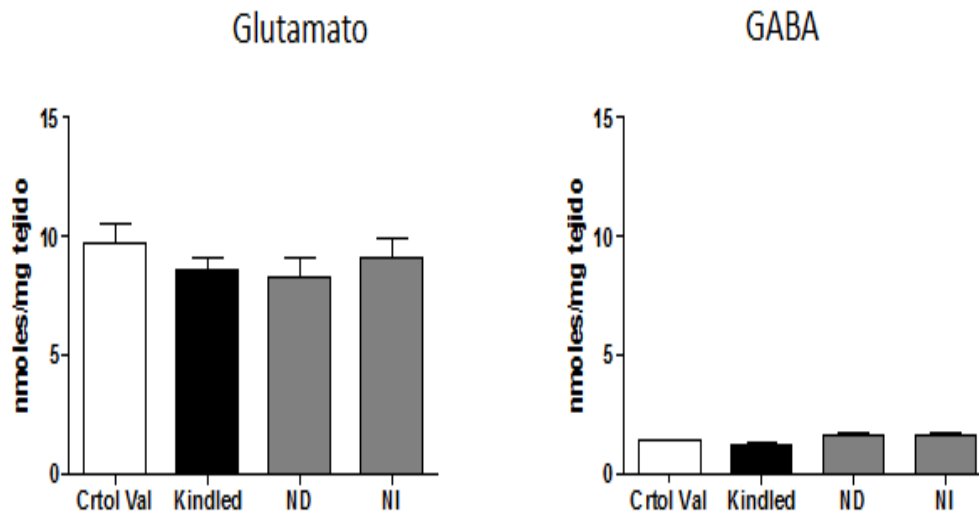
Los resultados obtenidos de la concentración de GABA Y GLUT en los grupos control, kindled, lesión de ND y lesión de NI en tres ratas, mostraron que de los dos aa en las cuatro estructuras cerebrales evaluadas, solo GABA del NR tiene diferencias significativas entre los grupos control y kindled y entre el grupo kindled y grupos con lesión de NI y ND (Gráficas 5, 6, 7 y 8).



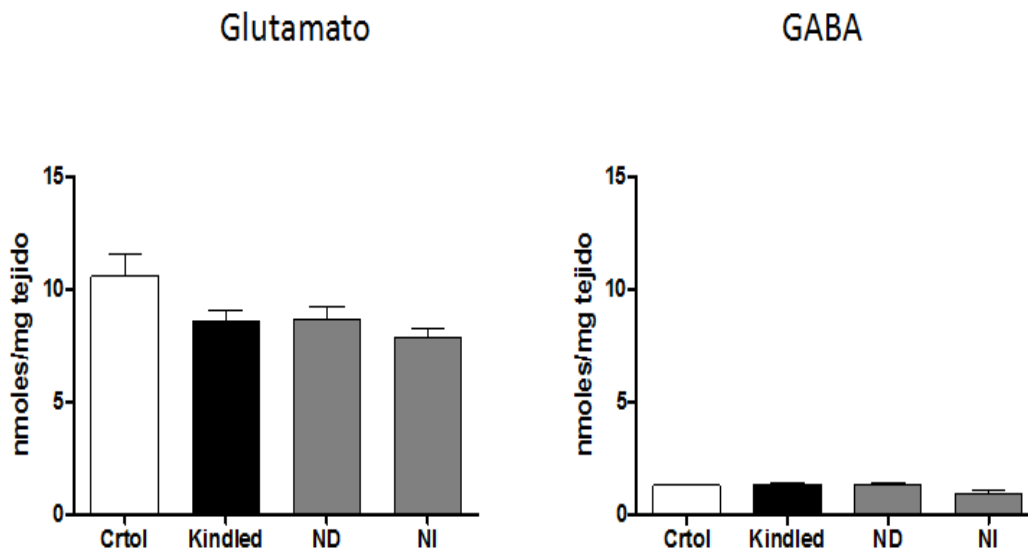
Gráfica 5. Concentraciones de GLUT y GABA expresadas en nanomoles por miligramo de tejido en el NR. Se observa diferencias entre el grupo control y el de kindled y también entre el grupo kindled comparado contra los de lesión en NI y ND. ANOVA seguido de Tukey. $p < 0.05$. (*). $p < 0.001$. (**). $n = 3$.



Gráfica 6. Concentraciones de GABA y GLUT expresadas en nanomoles por miligramo de tejido del TM. No se observa diferencias significativas entre los grupos. ANOVA. $n = 3$.



Gráfica 7. Concentraciones de GABA y GLUT expresadas en nanomoles por miligramo de tejido de la CM. No se observa diferencias significativas entre los grupos. ANOVA. n = 3.



Gráfica 8. Concentraciones de GABA y GLUT expresadas en nanomoles por miligramo de tejido del CB. No se observa diferencias significativas entre los grupos. ANOVA. n = 3.

VIII. ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La epilepsia es un desorden neurológico en el que la fisiopatología aún no está totalmente esclarecida. En este padecimiento el 30% de los pacientes no responden a los tratamientos farmacológicos convencionales (Cline y Roos., 2007; Velasco y cols., 2013), convirtiéndose en una enfermedad incapacitante en muchos de estos casos. Con la finalidad de proponer alternativas terapéuticas en pacientes con epilepsia de difícil control, se utilizan modelos experimentales en los cuales se evalúan nuevos tratamientos farmacológicos y no farmacológicos. De forma particular el modelo de epilepsia *kindling* es el más representativo y su importancia radica en las similitudes significativas con la epilepsia en humanos, permitiendo el estudio de crisis parciales producidas inicialmente que culminan en CG (Goddard y cols., 1969), de forma semejante como las que presentan los pacientes con crisis parciales secundariamente generalizadas, uno de los tipos más comunes y complejos de epilepsia en el mundo, además de que algunos mecanismos electrofisiológicos y bioquímicos son comunes tanto en el modelo como en el padecimiento, por ejemplo alteraciones iónicas y del equilibrio entre estímulos inhibitorios (GABA) y excitatorios (GLUT) (Brailowsky y cols., 1989; McNamara., 1994), daños estructurales neuronales (pérdida de las espinas dendríticas) (Fisher., 1989; Brailowsky y cols., 1997; Hallak y cols., 1993; Standley y cols., 1995), además de la presencia de sprouting (Sutula y cols., 1996).

Investigaciones utilizando el modelo *kindling* en diferentes especies animales, han conducido a grupos de investigación a proponer al CB como una región cerebral involucrada en la etiología, propagación y mantenimiento de las crisis epilépticas (Dow y cols., 1962; Guardiola y cols., 1977; Paz y cols., 1982; Paz y cols., 1985; Cicirata y cols., 1991; Paz y cols., 1991; Rubio y cols., 2004; Rubio y cols., 2011). Estudios de nuestro grupo de trabajo demostraron que la transección del PCS (Paz y cols., 1991), así como, la lesión unilateral del ND o NI con AK, disminuyen la duración de la actividad epiléptica (Rubio y cols., 2011). Por lo que en este trabajo nos propusimos estudiar el efecto de lesiones bilaterales de los ND y NI una vez asentadas las CG que se presentan en el

modelo del *kindling*, así como establecer las consecuencias neuroquímicas en la vía cerebelo rubro tálamo cortical. A nivel celular, se plantea la hipótesis que en el modelo de epileptogenesis inducido por administración de penicilina en gatos, el aumento de la actividad ictal en el CB refleja descargas exacerbadas de células de Purkinje GABAérgicas (Salgado-Benítez y cols., 1982), las cuales proporcionan la salida inhibitoria de la corteza cerebelosa (Ito y cols., 1970). Estas proyecciones inhibitorias modifican la salida del CB a través de los núcleos profundos (ND, NI y núcleo fastigial), que a su vez proyecta hacia el TM y de esta manera, el CB regula la actividad de las neuronas en otro lugar del cerebro como por ejemplo la corteza cerebral.

Aunado a lo anterior, en la neurobiología a nivel conductual, el CB es relacionado con el control motor, ya que lesiones parciales o totales a esta región causan alteraciones en el equilibrio y el movimiento (Gilman y cols., 1981). Reportes indican que a diferencia de la lesión unilateral, la lesión bilateral del ND puede ocasionar alteraciones de tipo motor, esto justificado a partir de que el ND recibe información de los hemisferios laterales, además de que la lesión a este núcleo causan alteraciones en las pruebas de rotarod (Auvray y cols., 1989; Caston y cols., 1995) y en la cuadrícula vertical (Joyal y cols., 1996). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la lesión bilateral en los ND o NI disminuyen el tiempo de duración de la crisis epiléptica y se presenta reversión de los estados conductuales en el modelo *kindling*; hallazgos que se correlacionan con observaciones previas donde la lesión unilateral del ND o NI disminuye el tiempo de duración de las crisis en este modelo (Rubio y cols., 2011), sin alterar la marcha o la postura.

Además, es importante señalar que en el trabajo de Auvray y cols., 1989, las ratas fueron cerebelectomizadas; a este respecto Jarrard E., 2002 menciona las ventajas de lesiones químicas en comparación con otros procedimientos como la aspiración, radiofrecuencia y lesiones electrolíticas, en las cuales se extrae tejido funcional. Como se mencionó con anterioridad las lesiones con AK presentan la ventaja de ser selectivas, debido a que es un agonista de receptores glutamatérgicos que solo actúa sobre los cuerpos neuronales y no

afectan las fibras, lo cual es de gran relevancia ya que en este trabajo únicamente incluimos las ratas en las cuales la lesión con AK fue circunscrita ya que al provocar muerte neuronal selectiva (Czubayko y cols., 2001; Monaghan y cols., 1986) en los ND y NI, no producimos daño en las fibras aferentes, eferentes o de paso, como fue demostrado por McGeer y cols., en 1978, y confirmado al demostrar en 2011 que no existen diferencias significativas en el número de cuerpos celulares de la corteza cerebelosa, núcleo pontino y OI, en comparación con el grupos control, además de que no hay difusión vía sistémica, ya que no hubo disminución en el número de células piramidales del hipocampo (Rubio y cols., 2011).

Se propone que el CB puede controlar impulsos de tipo inhibitorio a través del ND y NI debido a que los axones de estos núcleos forman parte de la principal eferencia cerebelosa, que además es parte importante de la vía cerebelo rubro tálamo cortical; por otra parte estudios proporcionan evidencia de que las terminales nerviosas cortico-rubrales, la otra principal vía aferente al NR, a partir de lesiones cerebelosas, presentan alteración en la transmisión colinérgica (Nieoullon y Dusticier., 1981) y GABAérgica (Nieoullon y Dusticier., 1981) en el NR. Por lo que en una primera aproximación al estudio de los mecanismos que están involucrados en la reducción de los parámetros electrográficos y conductuales del modelo *kindling* posterior a la lesión bilateral de los ND y NI, decidimos evaluar los niveles de los neurotransmisores GABA y GLUT en la CM, TM y NR y CB, con lo cual apoyaremos las observaciones de los cambios neuroquímicos que ocurren en el modelo de epilepsia al lesionar los núcleos cerebelosos.

Además, está reportado que cuando se desencadenan crisis epilépticas hay un aumento en la concentración de glucosa en CB, corteza y subcorteza (Eloqayli y cols., 2003), así como también se observa aumento en la concentración de glicógeno antes de presentarse las crisis epilépticas (Cloix y Hévor, 2009) indicando una elevación en la concentración de la fuente de energía. Por lo que la disminución en las concentraciones de GABA y GLUT se atribuye a que el metabolismo de la glucosa se orienta a la producción de energía (Tower, 1960;

Van Gelder y Courtois, 1972) y no a la producción de neurotransmisores. Esto directamente afecta la producción de GLUT y como GABA principalmente se sintetiza a partir de GLUT su concentración también se ve disminuida. Sin embargo la disminución de GLUT parece contraria al hecho de que por causa de las crisis epilépticas hay un aumento en la concentración de GLUT, además hay que tener en cuenta que en otras investigaciones hay un aumento en las concentraciones extracelulares de GLUT durante las crisis epilépticas (Ueda y Tsuru, 1994).

Previo a la determinación de los niveles de concentración de los aa en los grupos experimentales, se realizó una validación parcial del método analítico de determinación de aa por medio de la técnica de HPLC según la NOM-177-SSA1-1998 y la Guidance for industry Bioanalytical method validation 2001, con detección de fluorescencia del producto de derivatización con OPA previamente reportado por Roca y cols., 2003. La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido, por medio de estudios de laboratorio, que las características de comportamiento del método, cumple con el propósito para el cual fue diseñado, estas características se expresan en términos de validación. Los parámetros analíticos que se incluyen como mínimo en la validación de un método, son linealidad, precisión (evaluada como respetabilidad y reproducibilidad), exactitud, recuperación absoluta, límite de detección límite de cuantificación, estabilidad de la muestra analítica, selectividad y tolerancia. Una vez realizada nuestra validación parcial, podemos asegurar que nuestro método permite identificar y cuantificar los niveles de GLUT y GABA de manera precisa, tanto en las soluciones estándares como en las muestras de tejidos (Tabla 2, 3, 4, 5, 6 y 7; Figura 14, 15 y 16; Grafica 4); teniendo una recuperación de aa en tejido de rata (adición de estándar) que resulta adecuada, es decir %RC > 85%; así como las concentraciones basales de GLUT y GABA en CB y TM se encuentran en el orden de 1-11 nmoles/mg de tejido, datos que son similares a los obtenidos por otros autores (Löscher y cols., 1993; Freitas-Silva y cols., 2009; Eloqayli y cols., 2003; Okada y cols., 1971).

Con base en este método, nuestros resultados indican que las lesiones en los núcleos cerebelosos provocan el aumento significativo en los niveles de GABA en el NR, con lo cual se puede estar promoviendo la hiperpolarización de la membrana para la restauración del potencial de acción y la disminución de la liberación de GLUT, ya que se sabe que la hiperpolarización con la cual se restaura de éste potencial es atribuida a la liberación GABA (Engel, 1989) activando los receptores GABA_b, acoplados a proteínas G y segundos mensajeros, que presinápticamente provocan la disminución en la liberación de GLUT, así como la apertura de canales de K⁺, induciendo una corriente hiperpolarizante en la terminal presináptica para en conjunto restablecer el potencial de reposo neuronal (Miras, 2004). Éste aumento de GABA en el NR y el consecuente decremento de la concentración GLUT, puede también provocar que se reduzca la estimulación a los receptores NMDA, induciendo la disminución de las crisis ya que se ha reportado que la activación de los receptores NMDA por GLUT está implicado en la epilepsia (Gilbert, 1988; Zambrano y cols., 2011), debido a que al elevarse las concentraciones extracelulares de este neurotransmisor se presentan las crisis (Ueda y Tsuru, 1994).

Así mismo, en la vía cerebelo rubro tálamo cortical, el aumento de GABA a causa de la lesión del NI y ND y la posible consecuente reducción de GLUT, también puede tener alcances significativos ya que por medio de estos núcleos cerebelares se regula la actividad en la CM. Además la conexión del NI y ND con el TM (Cavdar y cols., 2002) (Gonzalez y Bernard, 2012), tiene participación importante debido a que el TM tiene implicaciones de que tipo glutamatérgica en la actividad epiléptica influyendo en la excitabilidad cortical, como se demostró con la estimulación de esta estructura en pacientes con convulsiones tónico clónicas generalizadas, los cuales tuvieron reducción significativa de la frecuencia de las crisis (Velasco F. y cols., 1987; Xiao Ling y cols., 2011). Así mismo se ha demostrado que al inyectar en el TM, NMDA se promueven la generación crisis epilépticas (Hirayasu y Wada, 1992).

En resumen nosotros proponemos que la ablación de las crisis en el modelo de *kindling*, se debe a la deafferentación del NR y TM por medio la lesión con AK en el NI o ND, la cual favorece el aumento de las concentraciones de GABA en estas estructuras y a su vez esta recuperación GABAérgica repercute en la disminución de la propagación de la PD hacia la CM. Además estos cambios de adaptación de la transmisión neuronal, así como el sprouting de terminaciones nerviosas corticorubral pueden contribuir a la recuperación funcional, por lo que este puede ser el mecanismo por el cual la lesión en los núcleos cerebelosos pueden estar reduciendo la duración de las CTCG y revistiendo los estados conductuales.

Por último, nosotros proponemos en un futuro realizar la evaluación de la vía cerebelo rubro tálamo cortical por medio de técnicas de histología y inmunohistoquímica, con la finalidad de ver las modificaciones morfológicas, fisiológicas y de la neuroplasticidad. También la realización de pruebas motoras, de conducta, aprendizaje, memoria en la rata, para recabar evidencias respecto a que si existe o no deterioro motor, conductual, de memoria y aprendizaje, derivado de la lesión de los ND y NI. Finalmente con los hallazgos de esta investigación se está aportando información de gran relevancia ya que abren diferentes líneas de investigación que involucran la lesión circunscrita de núcleos cerebelares como una estrategia terapéutica, sin olvidar que hace falta la participación de vías como la colinérgica en la disminución de las crisis en este modelo.

IX.CONCLUSIÓN

Con todas las evidencias encontradas en esta investigación nosotros concluimos que las lesiones en ND y NI juegan un papel primordial en la inhibición de las CTCG y la reversión de los estados conductuales en el modelo de epilepsia *kindling*, probablemente por el aumento del neurotransmisor inhibitorio GABA en el NR y su posible efecto inhibitorio hacia la vía cerebelo rubro tálamo cortical, además de que se aporta información de gran relevancia ya que se abren diferentes líneas de investigación que involucran la lesión circunscrita de núcleos cerebelares como una estrategia terapéutica.

X. REFERENCIAS

- ❖ Afifi A. y Bergman R. Neuroanatomía Funcional. Segunda edición. Editorial McGraw Hill Interamericana. México. 2006.
- ❖ Alexi T., Faull R. L. M., Hughes P.E. Variable susceptibility to neurotoxicity of systemic 3-nitropropionic acid. In: Sanberg, P.R., Nishino, H., Borlongan, C.V. (Eds.), Mitochondrial Inhibitors and Neurodegenerative Disorders. Humana Press, NJ (in press). 1999.
- ❖ Alonso Vanegas M. A. Métodos alternativos experimentales en el tratamiento quirúrgico de la Epilepsia: Radiocirugía y Estimulación Cerebral Profunda. En tratamiento para la epilepsia. Programa Prioritario de epilepsia. 2004.
- ❖ Alonso Vanegas M. A., Juan Austria-Velásquez, Mario López-Gómez, Erika Brust-Mascher. Estimulación crónica intermitente del nervio vago en el tratamiento de epilepsia refractaria. Experiencia en México con 35 casos. Ciruj. 78:15-24. Volumen 78, No. 1. 2010.
- ❖ Armijo J. A. Fármacos antiepilépticos y anticonvulsivos. En: Flórez J, Armijo J. A. y Mediavilla A. (eds). Farmacología humana 5ª ed. Barcelona: Capitulo 29. 2008.
- ❖ Auvray N., Caston J., Reber A., and Stelz T. Role of the cerebellum in the ontogenesis of the equilibrium behavior in the young rat: a behavioral study. Brain Res. Dec 29; 505(2):291-301. 1989.
- ❖ Battaglioli G., Liu, H., y Martin D. Kinetic differences between the isoforms of glutamate descarboxylase: implications for the regulation of GABA synthesis. Journal of Neurochemistry, 86, 879-887. 2003.
- ❖ Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by acid kainic: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. Neuroscience. 375-403. 1985.
- ❖ Berg Anne T., Samuel F., Berkovic, Martin J., Brodie, Jeffrey Buchhalter, J. Helen Cross, Walter van Emde Boas, Jerome Engel, Jacqueline French, Tracy A. Glauser, Gary W. Mathern, Solomon L., Moshe´ Douglas Nordli, Perrine Plouin, and Ingrid E. Scheffer. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. Epilepsia, 51(4):676–685. 2010.

- ❖ Berg Anne T. and Scheffer Ingrid E. New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century. *Epilepsia*, 52(6):1058–1062. 2011.
- ❖ Bostan Andreea C., Richard P. Dum, and Peter L. Strick. Cerebellar networks with the cerebral cortex and basal ganglia. *Trends in Cognitive Sciences*. Vol. 17, No. 5. May. 2013.
- ❖ Brailowky S., Silva-Barrat C., Naquet R. Elementos fisiopatológicos de las epilepsias: Aportes recientes de la investigación experimental. *Salud Mental*; 12:53-62. 1989.
- ❖ Brailowsky S., Hirish E., Merescaux CH. Elementos Fisiopatológicos de los procesos epilépticos. En Velasco F. A., Martínez M. D., Rubio D. F. *Epilepsia, aspectos neurológicos, médicos y sociales*. México: Ed. INNN UNAM: 103-157. 1997.
- ❖ Carl W. Cotman, Daniel T. Monaghan, Ole P. Ottersen and Jon Storm-Mathisen Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *TINS*, Vol 10, No. 7. 1987.
- ❖ Carreño Martínez Mar y José Serratosa Fernández. Cirugía de la epilepsia. En *Guías diagnósticas y terapéuticas de la Sociedad Española de Neurología Guía oficial de práctica clínica en epilepsia*, Sociedad Española de Neurología. ISBN: 1: 978-84-7989-750-5. 2012.
- ❖ Caston J., N. Jones, and T. Stelz. Role of Preoperative and Postoperative Sensorimotor Training on Restoration of the Equilibrium Behavior in Adult Mice Following Cerebellectomy. *Neurobiology of learning and memory* 64, 195–202. 1995.
- ❖ Cavdar Safiye F. Yilmaz I., Onat, Hasan R., Yananli, Ümit S., sehirli, Cumhur Tulay, Erdinç Saka and Esra Gürdal. Cerebellar connections to the rostral reticular nucleus of the thalamus in the rat. *J. Anat.* 201, pp485–491. 2002.
- ❖ Chusid Joseph G., Lorenzo Lizárraga García. *El Manual Moderno. Neuroanatomía correlativa y neurología funcional*. pp 544. 1983.
- ❖ Cicirata, C. Meli, C. Castorina, M. F. Serapide, V. Sorrenti, C. Di Giacomo, G. Gambera, A. Vanella, Neurotransmitter amino acid levels in rat thalamus and cerebral cortex after cerebellectomy, *Int. J. Dev. Neurosci.* 9: 365– 369. 1991.

- ❖ Cline J. S., Roos K. Treatment of status epilepticus with electroconvulsive therapy. *Journal of electroconvulsive therapy*. 23. 30-2. 2007.
- ❖ Cloix J., y Hévor, T. Epilepsy, regulation of brain energy metabolism and neurotransmission. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 841-853. 2009.
- ❖ Cotman C., Monaghan, D., Ottersen O., y Storm-Mathisen J. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends in Neurosciences*, 10(7), 273-280. 1987.
- ❖ Coyle J. T., Schwarcz, Zaczek. Microinjection of kainic acid into the rat hippocampus. *European Journal Pharmacology*. 50(3). 209-20. 1978.
- ❖ Coyle T. J. and Schwarcz. Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a mode for Huntingtons chorea. *Nature*. 263. 1976.
- ❖ Culic M., J. Saponjic, B. Jankovic, J. Rakicaponjic, B. Jankovic, L. Rakic, Effect of cerebellar stimulation on EEG power spectra in the acute model of epilepsy, *Indian J. Med. Res.* 100. 135–139. 1994.
- ❖ Czubayko U., Sultan F., Their P., Schwarz C. Two types of neurons in the rat Cerebellar nuclei as distinguished by membrane potentials and intracellular fillings. *Journal Physiology*.. 2017-2029. 2001.
- ❖ De Andrés I., Reinoso-Suárez F. Participation of the cerebellum in the regulation of the sleep-wakefulness cycle through the superior cerebellar peduncle. *Arch Ital Biol*;117:140-63. 1979.
- ❖ Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S. F. The Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacological Reviews*. 51:7-62. 1999.
- ❖ Dow R. S., Fernandez-Guardiola A., and Manni E. The influence of the cerebellum on experimental epilepsy. *EEG. Clin. Neurophysiol.* 14, 383-398. 1962.
- ❖ Eloqayli, H., Dahl, C., Götestman, K., Unsgård, G., Hadidi, H., & Sonnewald, U. Pentylentetrazole decrease metabolic glutamate turnover in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 85, 1200-1207. 2003.
- ❖ Engel Jerome. *Seizures and Epilepsy. Medical* - 536 pages. Davis. 1989.
- ❖ Fisher Robert S. Animal models of the epilepsies. *Brain Res Brain Res. Rev.*; 14(3):245-78. Jul-Sep. 1989.

- ❖ Fisher Robert S. y Bradley E. Alger. Electrophysiological mechanisms of kainic acid-induced epileptiform activity in the rat hippocampal slice. *Journal of Neuroscience*. Vol. 4, No. 5, pp. 1312-1323. May. 1984.
- ❖ Freitas-Silva D., Ferraz V., y Ribeiro Á. Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain. *Journal of Neuroscience Methods*, 177, 289-293. 2009.
- ❖ García G. Fernando. Epidemiología Cap. 2. En “Actualidades en epilepsia. Ed. “Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. “Manuel Velasco Suárez. pp. 23. Primera edición. 2003.
- ❖ Garcia Garcia M. E., I. Garcia Morales y J. Matías Guiu. Modelos experimentales en epilepsia. Instituto de Neurociencias, Servicio de Neurología, Hospital Clínico San Carlos, Universidad Complutense de Madrid, España. *Neurología*. 25(3):181-188. 2010.
- ❖ George Paxinos. *The Rat nervous system. Volume 2. Hindbrain and spinal cord*. 1985.
- ❖ Ghez C., Fahn S. The cerebellum. In: Kandel E. R., Schwartz J. H., Editors. *Principles of neural science*. 2nd ed. New York: Elsevier. p. 502–22. 1985.
- ❖ Gilbert M. The NMDA-receptor antagonist, MK-801, suppresses limbic kindling and kindling seizures. *Brain Research*, 463 (1), 90-99. 1988.
- ❖ Gilman S., Bloedel J. R., Lechtenberg R. *Disorders of the cerebellum*. Philadelphia. FA Davis. 189-221. 1981.
- ❖ Goddard G. V., McIntyre D. C., Leech C. K. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Experimental Neurology*. 25. 285-330. 1969.
- ❖ Gonzalez-Joekes and Bernard G. Schreurs. Anatomical Characterization of a Rabbit Cerebellar Eyeblink Premotor Pathway Using Pseudorabies and Identification of a Local Modulatory Network in Anterior Interpositus. *J. Neurosci*. 32(36):12472–12487. September 5. 2012.
- ❖ Groenewegen H., and Witter M. Thalamus. En G. Paxinos, *The Rat Nervous System*. 3rd ed. pp. 407-453, California: Elsevier. 2004.

- ❖ Guardiola Fernandez, A. H. Solis, j. L. Jurado, C. M. Contreras, M. Condes, and M. T. Gonzalez-Estrada. Influence of the cerebellum on certain types of behavior. Pages 77-96. In W. H. Sweet, s. Obrador, and j. Martin-rodriguez, Eds., Neurosurgical Treatm. 1977.
- ❖ Guidance for industry. Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER)- Center for Veterinary Medicine (CVM). May. 2001.
- ❖ Hallak M, Irtenkauf A. S., Janusz C., Cotton D. Stimulation and inhibition of NMDA receptors in rats. Developing a seizure model. A J GO. 169: 695-699. 1993.
- ❖ Halpern Casey H., Uzma Samadani, Brian Litt, Jurg L. Jaggi, and Gordon H. Baltuch. Deep Brain Stimulation for Epilepsy Neurotherapeutics. 5(1): 59–67. January. 2008.
- ❖ Herrick C. J. Origin and evolution of the cerebellum. Arch Neuroi Psychiat 11:621 652. 1924.
- ❖ Hirayasu Y., Wada J. A. N-methyl-d-aspartate injection into the massa intermedia facilitates development of limbic kindling in rats. Epilepsia: 33:965–970. 1992.
- ❖ Holschneider D. P., J. Yanga, Y. Guoa, J. M. Maarekd. Reorganization of functional brain maps after exercise training: Importance of cerebellar–thalamic–cortical pathway. Brain research. 1184.96 –107. 2007.
- ❖ Hong Jinpyo, Ik-Hyun Cho, Kyung Il Kwak, Eun Cheng Suh, Jinsoo Seo, Hyun Jung Min, Se-Young Choi, Chong-Hyun Kim, Seung Hwa Park, Eun-Kyeong Jo, Soojin Lee, Kyung Eun Lee and Sung Joong Lee. Microglial Toll-like Receptor 2 Contributes to Kainic Acid-induced Glial Activation and Hippocampal Neuronal Cell Death. J. Biol. Chem. 285:39447-39457. 2010.
- ❖ International League Against Epilepsy (Web en linea). <http://www.ilae.org>. Consulta: 10-7-2014.
- ❖ International League Against Epilepsy. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Epilepsia 30:389-99. 1989.

- ❖ International League Against Epilepsy. 1981.
- ❖ Ito M. *The Cerebellum and Neural Control*, Raven Press, New York. 1984.
- ❖ Ito M. Yoshida K., Obata N., Kawai M., Udo. Inhibitory control of intracerebellar nuclei by the Purkinje cell axons. *Experimental Brain Research*. January 28, Volume 10, Issue 1, pp 64-80. 1970.
- ❖ Jarrard L. E. Use of excitotoxins to lesion the hippocampus: Update. *Hippocampus*. 12(3):405-14. 2002.
- ❖ Joyal C. C., C. Meyer, G. Jacquart, P. Mahler, J. Caston, R. Lalonde. Effects of midline and lateral cerebella lesions on motor coordination and spatial orientation. *Brain Research* 739 1-11. 1996.
- ❖ Juha Järvelä. *Kainic acid-induced seizures: Inflammation and excitotoxic neuronal damage in the developing rat hippocampus*. Turun yliopisto university of turku Turku. 2011.
- ❖ Khurgel Moshe, Gwen O. Ivy. Astrocytes in kindling: relevance in epileptogenesis. *Epilepsy Research* 26. 163-175. 1996.
- ❖ Kiernan J. *El sistema nervioso humano: un punto de vista anatómico (8^a ed.)*. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana. 2006.
- ❖ Kopeloff L. M., Barrera S. E., Kopeloff N. Recurrent convulsive seizures in animals produced by immunologic and chemical means. *Am J Psych* 98:881-902. 1942.
- ❖ Kwan patrick, Alexis Arzimanoglou, Anne T. Berg, Martin J. Brodie, W. Allen Hauser, Gary Mathern, Solomon L. Moshe, Emilio Perucca, Samuel Wiebe, and Jacqueline French. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 51(6):1069–1077. 2010.
- ❖ Lallement G., Carpentier P., Collet A., Pernot-Marino I., Baubichon D., Sentenac-Roumanou H., Blanchet G. Involvement of glutamatergic system of amygdala in generalized seizures induced by soman: Comparison with the hippocampus. *C R Acad Sci III*. 313(9):421-6. 1991.

- ❖ Löscher W., Hörstermann D., Hönack D., Rundfeldt C., y Wahnschaffe, U. Transmitter amino acid levels in rat brain regions after amygdala-kindling: evidence for a pro-kindling effect of prolonged electrode implantation. *Neurochemical Research*, 18 (7), 775-781. 1993.
- ❖ Lu Xiaofeng, Shigehiro Miyachia, and Masahiko Takada. Anatomical evidence for the involvement of medial cerebellar output from the interpositus nuclei in cognitive functions. 18980–18984. *PNAS*. vol. 109. No. 46. November 13. 2012.
- ❖ McGeer P.L., E.G. McGeer, T. Hattori, in: E.G. McGeer. *Kainic Acid a Tool in Neurobiology*, Raven Press, New York, pp. 123–138. 1978.
- ❖ McNamara James. Cellular and Molecular Basis of Epilepsy. *The Journal of Neuroscience*, 14(6): 34133425. June. 1994.
- ❖ McNamara James. Kindling: an animal model of complex partial epilepsy. *Annals of Neurology*, 16 (supplement 1), S72-S76. 1984.
- ❖ Meyer Ana-Claire, Tarun Dua, Juliana Ma, Shekhar Saxenab y Gretchen Birbeck. Global disparities in the epilepsy treatment gap: A systematic review. *Bull World Health Organ*. 88:260–266. 2010.
- ❖ Miras-Portugal M. T. Enfermedades neurales Y neurodegenerativas: Nuevos avances moleculares y farmacológicos Despolarización de la membrana neuronal. Instituto de España Madrid. 2004.
- ❖ Monaghan P. L., Beitz A. J., Larson A. A., Altschuler R. A., Madl J. E., Mulett M. A. Immunocytochemical localization of glutamate-gluaminase and aspartate aminotrasferase-like immunoreactivity in the deep cerebellar nuclei. *Brain Research*. 363. 364-370. 1986.
- ❖ Nieoullon Andre y Nicole Dusticier. Decarboxylase activity in the red nucleus of the adult cat after cerebellar lesions. *Brain Research*, 224. 129-139. 1981.
- ❖ Nieoullon Andre y Nicole Dusticier. Decrease in choline acetyltransferase activity in the red nucleus of the cat after cerebellar lesión. *Neurosciences*. 6(8);1633-1641). 1981.

- ❖ Nieoullon Andre, Ghislaine Vuillon-Cacciuttolo, Nicole Dusticier, Lydia Kerkerian, Daniel Andre and Olivier Bosler. Putative neurotransmitters in the red nucleus and their involvement in postlesion adaptive mechanisms. Behavioural Brain Research, 28. 163-174. 1988.
- ❖ Norma oficial Mexicana. NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
- ❖ Norma Oficial Mexicana. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- ❖ Okada, Y., Nitsch-Hassler, C., Kim, J., Bak, I, & Hassler, R. Role of γ -aminobutyric acid (GABA) in the extrapyramidal motor system 1. Regional distribution of GABA in rabbit, rat, guinea pig and baboon CNS. Experimental Brain Research, 13, 514-518. 1971.
- ❖ Organización Mundial de la Salud (OMS), (Web en línea). <http://www.who.int>. Consulta: 10-7-2014.
- ❖ Paxinos G., C. H. Watson, The Rat Brain in Sterotaxic Coordinates, Academic Press, New York. 1998.
- ❖ Paxinos G., C. H. Watson, The Rat Brain in Sterotaxic Coordinates, Academic Press, New York. 1982.
- ❖ Paz C., Reygadas E. and Fernandez Guardiola A. Sleep alterations following total cerebellectomy in cats. Sleep 5(3):218-226. 1982.
- ❖ Paz C., Gutierrez-Baeza F., Bazán B. Transection of the superior cerebellar peduncle interferes with the onset a duration of generalized seizures induced by amigaloid kindling. Brain Research. 558. 90-92. 1991.
- ❖ Paz C., Reygadas E., Fernandez-Guardiola A. Amigaloid kindling: In totally cerebeloectomized cats. Experimental Neurology. 88. 418-424. 1985.
- ❖ Pérez-Neri Iván, Sergio Montes, Marie-Catherine Boll, Jesús Ramírez-Bermúdez, Camilo Río. Liquid chromatographic–fluorimetric method for the estimation of nitric oxide biosynthesis in the central nervous system. Journal of Chromatography B, 806..133–139. 2004.

- ❖ Pérez-Neri Ivan, Elvira Castro, Sergio Montes, Marie-Catherine Boll, Juan Barges-Coll, José Luis Soto-Hernández, Camilo Ríos. Arginine, citrulline and nitrate concentrations in the cerebrospinal fluid from patients with acute hydrocephalus. *Journal of Chromatography B*, 851. 250–256. 2007.

- ❖ Pérez-Severiano Francisca, Juan Carlos Martínez-Lazcano, Alicia Sánchez-Mendoza, Dinora Gonzalez-Esquivel y Camilo Ríos. Evidences of the participation of oxidative stress in an experimental model of Huntington Disease included by quinolinic acid. *Models of Neuropharmacology*. 2008.

- ❖ Racine, R. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 32, 281-294. 1972.

- ❖ Ramón y Cajal. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Paris: Maloine, vol2. 1911.

- ❖ Roca, P., Oliver, J., y Rodríguez, A. *Bioquímica, técnicas y métodos*. Madrid: Editorial Hélice. 2003.

- ❖ Rubio C., Custodio V., Gonzalez E., Retana-Marquez S., López-Lopez M. y Paz C. Effects of kainic acid lesion on the cerebellar interpositus and dentate nuclei in amygdaloid kindling in rats. *Brain Research Bulletin* 85. 64–67. 2011.

- ❖ Rubio C., Custodio V., Juárez F. y Paz C. Stimulation of the superior cerebellar peduncle during the development of amygdaloidal kindling in rats. *Brain Research*. 1010. 151-155. 2004.

- ❖ Salgado-Benítez A., Briones R., Fernández-Guardiola A. Purkinje cell responses to a cerebral penicillin-induced epileptogenic focus in the cat. *Epilepsia*. Dec; 23(6):597-606. 1982.

- ❖ Scott B. W., Wang S., Burnham W. M., De Boni U., Wojtowicz J. M. Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Neurosci Lett*. 29;248(2):73-6. May. 1998.

- ❖ Schwartzkroin P. Basic mechanism of epileptogenesis. En E. Willye (Ed.), *The treatment of epilepsy: Principles and practice* (p.83-98), Philadelphia: Lea and Febiger. 1993.

- ❖ Snell Richard. Neuroanatomía clínica. 5ª ed., Editorial panamericana, Argentina. 2001.
- ❖ Standley C. A., Brian A., Mason M., Cotton D. V. Differential regulation of seizure activity in the hippocampus of male and female rats. 176:1160-1167. 1995.
- ❖ Sutula T., Koch J., Golarai G., Watanabe Y. and Mcnamara, James. J. Neurosci. 16,7398-7406. 1996.
- ❖ Tower D. Neurochemistry of Epilepsy: Seizure Mechanisms and their Management. Springfield: Charles C. Thomas. 1960.
- ❖ Ueda Y. y Tsuru N. Bilateral seizure-related changes of extracellular glutamate concentration in hippocampi during development of amygdaloid kindling. Epilepsy Research, 18 (1), 85-88. 1994.
- ❖ Van Gelder N., y Courtois A. Close correlation between changing content of specific amino acids in epileptogenic cortex of cats, and severity of epilepsy. Brain Research, 43 (2), 477-484. 1972.
- ❖ Velasco Feria A., Martínez de Muñoz D., Rubio Donnadiou F. Epilepsia, un enfoque multidisciplinario. Segunda edición, México: Trillas, 382 pp. 1989.
- ❖ Velasco Feria, Velasco M., Ogarrio C., Fanghanel G. Electrical stimulation of the centromedian thalamic nucleus in the treatment of convulsive seizures: a preliminary report. Epilepsia. 28(4):421-30. Jul-Aug. 1987.
- ❖ Velasco Monroy Ana Luisa, Gustavo Aguado Carrillo, Lizbeth Sandoval Olivares y Daruny Vázquez Barrón. Valor pronóstico de los registros intracraneales en la lobectomía temporal anterior con hipocampectomía. Gaceta Médica de México. 149:143-51. 2013.
- ❖ Voogd J. Comparative aspects of the structure and fibre connections of the mammalian cerebellum. Prog Brain Res 25:94–135. 1967.
- ❖ Wang Q., Yu S., Simonyi A., Sun G., y Sun A. Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. Molecular Neurobiology, 31 (1-3), 3-16. 2005.
- ❖ Waxman Stephen. Neuroanatomía clínica. Vigésimo sexta edición. McGraw-Hill Interamericana. 2011.

- ❖ Xiang-Yu Zheng, Hong-Liang Zhang, Qi Luo, and Jie Zhu. Kainic Acid-Induced Neurodegenerative Model: Potentials and Limitations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 457079. 2011.
- ❖ Xiao-Ling Zhong, Jin-Tai Yu, Qun Zhang. Nai-kDong Wang. Lan Tan. Deep brain stimulation for epilepsy in clinical practice and in animal models. *Brain Research Bulletin*. 85. 81–88. 2011.
- ❖ Xing-Mei Zhang and Jie Zhu. Kainic Acid-Induced Neurotoxicity: Targeting Glial Responses and Glia-Derived Cytokines. *Current Neuropharmacology*, 9, 388-398. 2011.
- ❖ Zambrano Martin Torres, José Luis Bustos Sánchez, Freddy Granados Llamas. Fisiopatología del estatus epiléptico Pathophysiology of status epilepticus *Acta Neurol Colomb* Vol. 27 No. 1 Marzo Suplemento (1:1). 2011.
- ❖ Zhang X., y Zhu J. Kainic Acid-induced neurotoxicity: targeting glial response and glia-derived cytokines. *Current Neuropharmacology*, 9, 388-298. 2011.

XI. ANEXOS

XI.1 Eventos científicos.

1er. Simposium Iberoamericano de Farmacia Social. “Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. 22 de junio de 2012.

- “Estudio de costo/efectividad de medicamentos antiepilépticos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía”.

Participación: Cartel



4a. Reunión de Alumnos y Egresados. Maestría en Ciencias Farmacéuticas.
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. 21 de septiembre de 2012.

Participación: Asistencia.



XXVIII Reunión de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". 23 y 24 de mayo de 2013. Impartido en las instalaciones del mismo instituto.

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

XXVIII Reunión Anual de Investigación

**Conferencias Magistrales,
Presentaciones Orales y Carteles
sobre Neurociencias**

Mayo 23 y 24 de 2013
9:00-14:00 h
Auditorio

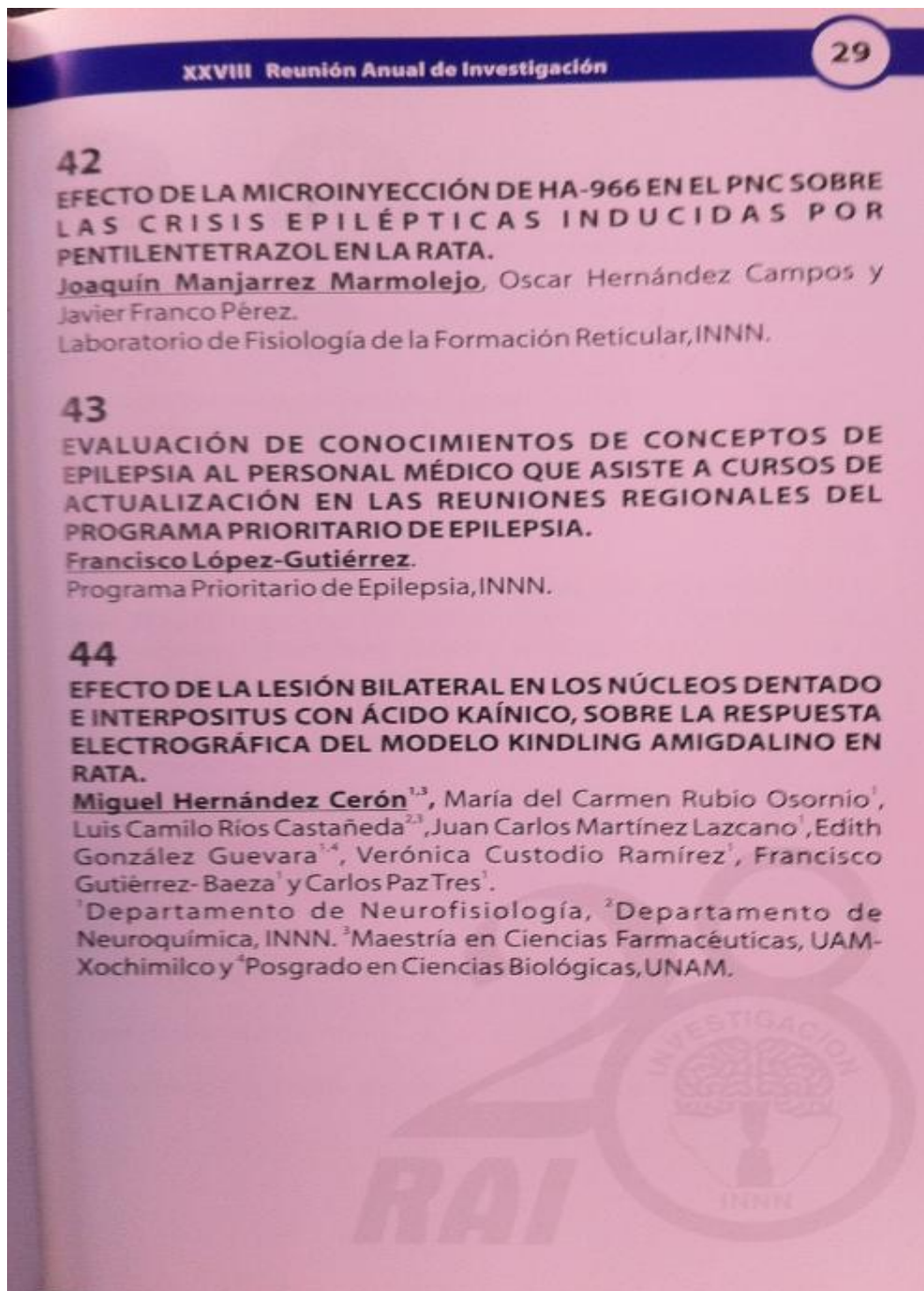
Simposio Satélite
"Las Demencias:
Estado Actual
del Conocimiento"

Mayo 21 y 22 de 2013
10:00-14:00 h
Auditorio

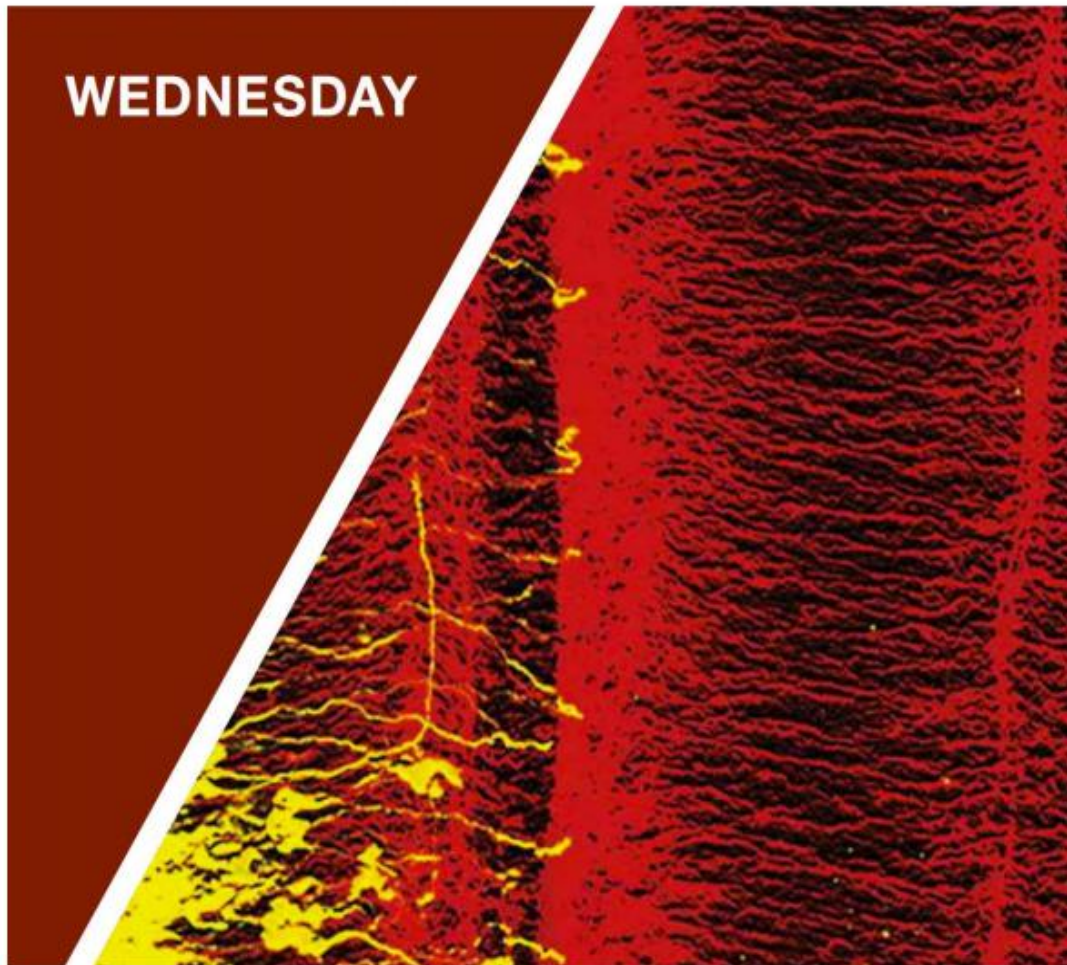
www.innn.salud.gob.mx/interior/investigacion/investigacion

- "Efecto de la lesión bilateral en los núcleos dentado e interpositus con ácido kaínico, sobre la respuesta electrográfica del modelo *kindling* amigdalino en rata".

Participación: Cartel



43rd Annual Meeting of Neuroscience. November 13, 2013. San Diego, California.



SAN DIEGO | NOVEMBER 13
Scientific Session Listings 681 – 873



- "The kainic acid lesion in cerebral nuclei shorten the duration of generalized seizures in the *kindling* model of epilepsy".

Participación: Cartel. B28-701.10

10:00 B6 **700.15** Prenatal inhibition of the kynuramine pathway leads to changes in synaptic proteins and neurogenesis markers in the adult rat offspring. G. S. KHALLIL*, M. PISAR, C. M. FORREST, L. G. DARLINGTON, T. W. STONE. *Univ. of Glasgow, Epsom Gen. Hosp.*

11:00 B7 **700.16** The effects of developmental exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) on the hippocampus in American mink (*Neovison vison*). D. K. BURGER*, M. ZWIERNIK, W. FOLLAND, S. J. BURSIAK, A. N. IWANIUK. *Univ. of Lethbridge, Michigan State Univ.*

8:00 B8 **700.17** Resveratrol modulates the hippocampal neurogenic- and learning and memory processes in middle age mice. G. B. RAMIREZ-RODRIGUEZ*, Sr.; M. TORRES-PÉREZ, R. TELLEZ-BALLESTEROS, N. M. VEGA-RIVERA, L. ORTIZ-LÓPEZ, G. KEMPERMANN. *Natl. Inst. of Psychiatry, Natl. Inst. of Psychiatry, Ctr. for Regenerative Therapies Dresden (CRTD).*

9:00 B9 **700.18** THIP promotes neuron survival in organotypic hippocampal slice cultures. A. J. MOSA*, Y. TAN, S. WANG, M. WOJCIOWICZ. *Univ. of Toronto.*

10:00 B10 **700.19** Altered adult neurogenesis, mRNA expression, and depressive-like behaviors induced by perinatal arsenic exposure are rescued by chronic fluoxetine treatment. C. R. TYLER*, A. M. ALLAN. *Univ. of New Mexico.*

11:00 B11 **700.20** Andrographolide stimulates neurogenesis in the adult hippocampus. L. VARELA-NALLAR*, C. TAPIA-ROJAS, S. B. ARREDONDO, N. C. INESTROSA. *Fac. Ciencias Biológicas, P. Univ. Católica De Chile, Ctr. de Investigaciones Biomédicas (CIB), Facultad de Ciencias Biológicas y Facultad de Medicina, Univ. Andrés Bello.*

8:00 B12 **700.21** • ▲ Ascending exercise increases neurogenesis in the dentate gyrus of adult mouse. S. KUREBAYASHI*, T. MORI, T. WAKABAYASHI, T. KOIKE, H. YAMADA. *Shizuoka University, Kansai Med. Univ.*

9:00 B13 **700.22** Atypical antipsychotics promote GABA interneurogenesis in the adult brain: Implication of HSP production. W. UKAI*, H. KANETA, M. KIGAWA, E. HASHIMOTO, T. ISHII, K. FURUSE, Y. KAKUTANI, H. TSUJINO, T. IMAI, S. KOBAYASHI, T. SAITO. *Sapporo Med. Univ.*

10:00 B14 **700.23** Curcumin increases memory retention and hippocampal neurogenesis in young mice. H. PARK*, E. LEE, Y. LEE, J. LEE. *Pusan Natl. Univ.*

11:00 B15 **700.24** Effects of gender and environmental enrichment on astrocyte gene expression across ages. N. SALMASO*, S. DAVIS-COOPER, F. M. VACCARINO. *Yale Univ.*

8:00 B16 **700.25** The MMP-1/PAR-1 axis modulates adult hippocampal neurogenesis in vitro. M. VALENTE*, M. ALLEN, S. LIM, K. CONANT, M. GRILLI. *Univ. of Piemonte Orientale A. Avogadro, Georgetown Univ.*

9:00 B17 **700.26** Structural characterization of the extracellular domain of caspr2 and its association with tag-1. E. N. RUBIO-MARRERO, G. VINCELLI, H. KIM, G. FALIVELLI, T. SHAIKH, B. DEMELER, P. TAYLOR, D. COMOLETTI*. *Child Hlth. Inst. of New Jersey, Skaggs Sch. of Pharm. and Pharmaceut. Sciences, Univ. of California San Diego, Central European Inst. of Technology, Masaryk Univ., The Univ. of Texas Hlth. Sci. Ctr.*

10:00 B18 **700.27** An analysis of the effects of gestational exposure to particulate air pollution on behavioral and developmental outcomes. N. C. WOODWARD*, P. PAKBIN, C. SIOUTAS, C. E. FINCH, T. E. MORGAN. *USC.*

POSTER

701. Amino Acids
Theme B: Neural Excitability, Synapses, and Glia: Cellular Mechanisms
Wed. 8:00 AM – San Diego Convention Center, Halls B-H

8:00 B19 **701.01** Is the elevation of D-aspartate in brain regions of high proliferative activity specific for learning? A. L. CSILLAG*, T. JAKÓ, A. SZABÓ, Z. WAGNER, T. TÁBI, E. SZÓKA, G. ZACHAR. *Semmelweis Univ. Med., Semmelweis Univ. Med., Semmelweis Univ. Med.*

9:00 B20 **701.02** Analysis of roles of D-Serine and D-Aspartic acid at central pattern generator in buccal ganglion of *Aplysia*. R. KIMURA*, Y. YOSHIMI, T. NAGAHAMA. *Dept. Appl. Chem., Shibaaura Inst. Technol., Dept. Biophys., Fac. Pha. Sci., Toho Univ.*

10:00 B21 **701.03** D-serine in glia and neurons derives from 3-phosphoglycerate dehydrogenase. J. T. EHMSSEN*, T. MA, H. SASON, D. ROSENBERG, T. DGO, S. FURUYA, S. H. SNYDER, H. WOLOSKER. *Johns Hopkins, Technion-Israel Inst. of Technol., Kyushu Univ.*

11:00 B22 **701.04** Serine racemase function is modulated by interaction with synaptic proteins. T. MA*, S. H. SNYDER. *Johns Hopkins Univ. Sch. of Med.*

8:00 B23 **701.05** • The majority of D-serine and serine racemase is localized to neurons in the adult mammalian brain. D. T. BALU*, S. TAKAGI, M. D. PUHL, M. A. BENNEYWORTH, J. T. COYLE. *McLean Hosp. / Harvard Univ., Grad. Sch. of Med. and Dent. Sciences, Tokyo Med and Dent. Univ.*

9:00 B24 **701.06** Mg²⁺ mobilization mediated by both GABA(A) and GABA(B) receptors in rat hippocampal neurons. R. YAMANAKA*, Y. SHINDO, K. HOTTA, K. SUZUKI, K. OKA. *KEIO UNIVERSITY.*

10:00 B25 **701.07** Glutathione is a physiologic reservoir of neuronal glutamate. M. KOGA*, G. M. PARKER, J. KIM, S. P. BROWN, L. D. HESTER, Y. TANIGUCHI, A. KAMIYA, S. H. SNYDER, A. SAWA, T. W. SEDLAK. *The Johns Hopkins Univ. Sch. of Med., The Johns Hopkins Univ. Sch. of Med.*

11:00 B26 **701.08** Fatty acid binding protein 3 (FABP3) regulates cognitive function and an anxiety behaviors. Y. YAMAMOTO*, K. SHARIFI, A. ISLAM, M. EBRAHIM, Y. KAGAWA, Y. YASUMOTO, H. MIYAZAKI, S. KAWAMURA, T. SAWADA, N. TOKUDA, K. FUKUNAGA, Y. OWADA. *Yamaguchi Univ., Tohoku Univ.*

8:00 B27 **701.09** • Proteomic analysis of rat prefrontal cortex after chronic valproate treatment. T. MUTHUSAMY*, R. S. SEELAN, C. F. MANUEL, R. N. PARTHASARATHY. *Univ. of Louisville, VA Med. Ctr., Univ. of Louisville and VA Med. Ctr.*

9:00 B28 **701.10** The kainic acid lesions in cerebellar nuclei shorten the duration of generalized seizures in the kindling model of epilepsy. M. H. CERÓN*, SR, M. RUBIO OSORNIO, L. RÍOS CASTAÑEDA, J. MARTÍNEZ LAZCANO, E. GONZÁLEZ GUEVARA, V. CUSTODIO RAMÍREZ, C. PAZ TRES. *Inst. Nacional De Neurología Y Neurocirugía, Univ. Autónoma Metropolitana, Univ. Nacional Autónoma de México.*

10:00 B29 **701.11** Global inhibition of protein synthesis stimulates nitric oxide/cGKI pathway to decrease excitatory cell death through AKT activation. M. COSSENZA*, R. SOCODATO, T. MEJÍA-GARCÍA, I. DOMITH, C. G. PORTUGAL, L. F. GLADULICH, R. PAES-DE-CARVALHO. *Federal Fluminense Univ.*

8 | Society for Neuroscience

* Indicates a real or perceived conflict of interest, see page 144 for details.
▲ Indicates a high school or undergraduate student.

XXIX Reunión de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". 20 al 23 de mayo de 2014. Impartido en las instalaciones del mismo instituto.

50 Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
Manuel Velasco Suárez
Quincuagésimo Aniversario

XXIX Reunión Anual de Investigación

**Conferencias Magistrales,
Presentaciones Orales y Carteles
sobre Neurociencias**

Mayo 22 y 23 de 2014
9:00 - 14:00 h
Auditorio

20 RAI

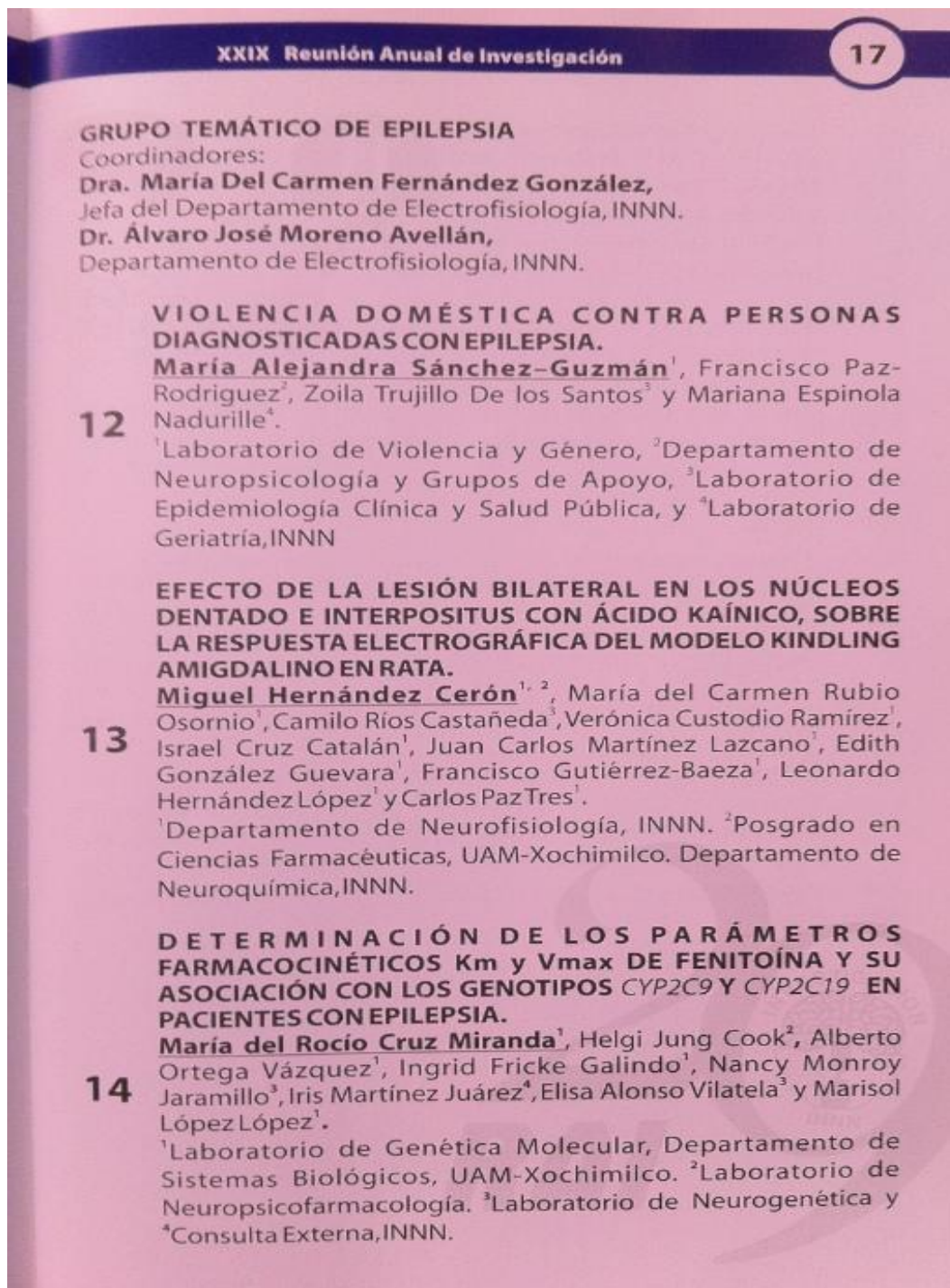
Simposio Satélite
"Epilepsia: aspectos médicos, sociales, de investigación y nuevos tratamientos"
Mayo 20 y 21 de 2014
9:00 - 14:00 h
Auditorio

www.somospacientes.com

SALUD | *Comunidad Dispositivos Neurológicos* | MOVER MÉXICO

- "Efecto de la lesión bilateral en los núcleos dentado e interpositus con ácido kaínico, sobre la respuesta electrográfica del modelo *kindling* amigdalino en rata"

Participación: Cartel



- "Efectos morfológicos de la lesión bilateral en los núcleos dentado e interpositus en el modelo *kindling* amigdalino en rata"

Participación: Cartel

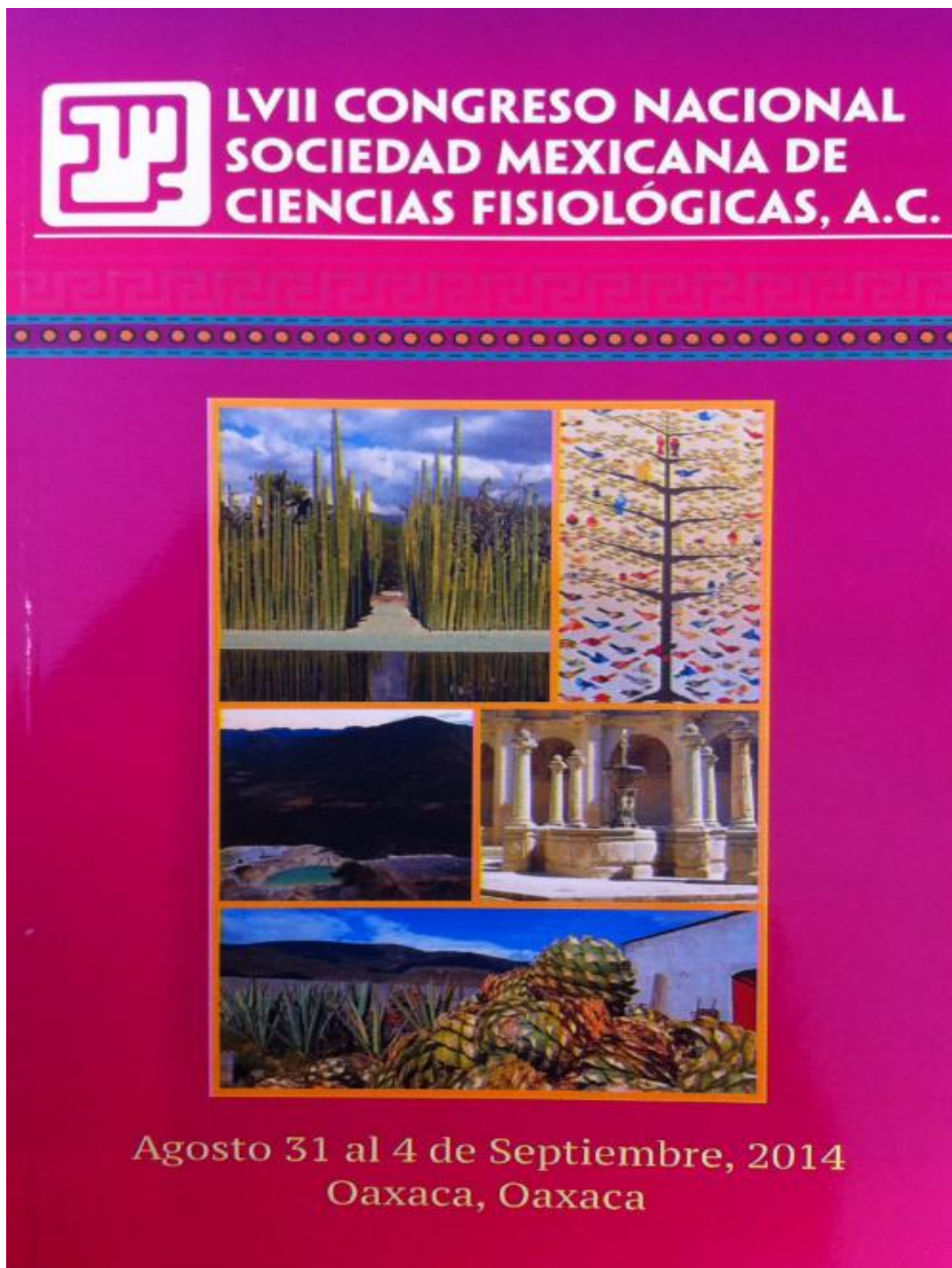
18 Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

15 EFECTO DE LA MICROINYECCIÓN DE GABA EN EL NÚCLEO RETICULARIS PONTIS CAUDALIS SOBRE LAS CRISIS PROVOCADAS POR PTZ EN LA RATA.
Moisés Aristeo Rodríguez Díaz, Joaquín Manjarrez Marmolejo, Javier Franco-Pérez
Lab. Fisiología de la Formación Reticular, INNN.

16 EFECTOS MORFOLÓGICOS DE LA LESIÓN BILATERAL EN LOS NÚCLEOS DENTADO E INTERPOSITUS EN EL MODELO KINDLING AMIGDALINO EN RATA.
María del Carmen Rubio Osornio, Verónica Custodio Ramírez, Miguel Hernández Cerón, Leonardo Hernández López, Edith González Guevara, Juan Carlos Martínez Lazcano, y Carlos Paz Tres.
Departamento de Neurofisiología, INNN.

17 LAS VARIANTES GENÉTICAS DE *ABCC2* NO SE ASOCIAN A EFECTOS ADVERSOS NEUROLÓGICOS NI A RESPUESTA A CARBAMAZEPINA EN PACIENTES MESTIZO MEXICANOS.
Ingrid Fricke Galindo¹, Helgi Jung Cook², Iris E. Martínez Juárez³, Adrián LLerena⁴, Alberto Ortega Vázquez¹, Nancy Monroy Jaramillo⁵, María Elisa Alonso Vilatela⁵, Marisol López López¹.
¹Laboratorio de Genética Molecular y Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco. ²Departamento de Neuropsicofarmacología, y. ³Laboratorio de Investigación Clínica, INNN. ⁴CICAB/Escuela de Medicina Universidad de Extremadura. España. ⁵Departamento de Neurogenética, INNN.

LVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, a celebrarse en la Ciudad de Oaxaca, México, del 31 de agosto al 4 de septiembre de 2014.



- “Lesiones de núcleos cerebelosos incrementan GABA en el núcleo rojo en ratas con *kindling* amigdalino”.

Participación: Presentación oral.



Lesiones de núcleos cerebelosos incrementan GABA en el núcleo rojo en ratas con *kindling* amigdalino

Autores:

Cruz Catalán Israel (estudiante de licenciatura)^{1,2}, Hernández Cerón Miguel^{1,2}, Martínez Lazcano Juan Carlos¹, Rubio Osornio María del Carmen¹, Custodio Ramírez Verónica¹, Paz Tres Carlos¹

Instituciones:

¹Departamento de Neurofisiología, INNN "MVS"

²UAM-X.

Resumen

Previamente se ha demostrado que las lesiones con ácido kaínico de los núcleos cerebelosos (dentado o interpósito) reducen significativamente la duración de las crisis generalizadas (CG) provocadas mediante el modelo experimental de epilepsia *kindling*. Sin embargo, no se conocen las alteraciones provocadas en las proyecciones eferentes, como consecuencia de las lesiones de estos núcleos. Con este propósito, se evaluaron los neurotransmisores glutamato y GABA mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en el cerebelo, corteza motora así como, en los núcleos rojo y talámico en ratas machos de la cepa Wistar con CG. Los resultados muestran un decremento significativo ($P < 0.05$) de GABA en el núcleo rojo en ratas con CG; sin embargo, en las ratas con CG más lesión de los núcleos dentado o interpósito presentan incremento significativo ($P < 0.05$) de este neurotransmisor. La presencia de glutamato no se modificó en estos núcleos ni en las otras estructuras evaluadas, en las cuales tampoco se modificaron las concentraciones de GABA. Por lo tanto, podemos concluir que la deficiente aferencia glutamatérgica en la vía cerebelo-rubro-tálamo-cortical, provoca incremento en los niveles de GABA en el núcleo rojo, impidiendo la propagación de la actividad epiléptica al tálamo y la corteza, disminuyendo la severidad de las crisis.

XI.2 Publicaciones

“Artículos”

Martínez-Lazcano JC, González-Guevara E, Del Carmen Rubio M, Franco-Pérez J, Custodio V, **Hernández-Cerón M**, Livera C, Paz C. The effects of ozone exposure and associated injury mechanisms on the central nervous system. *Rev Neurosci*. 2013;24(3):337-52. doi: 10.1515/revneuro-2012-0084.

Participación: Apartado de Epilepsy and O₃.

DE GRUYTER

DOI 10.1515/revneuro-2012-0084 — Rev. Neurosci. 2013; aop

Juan Carlos Martínez-Lazcano, Edith González-Guevara, María del Carmen Rubio, Javier Franco-Pérez, Verónica Custodio, Miguel Hernández-Cerón, Carlos Livera and Carlos Paz*

The effects of ozone exposure and associated injury mechanisms on the central nervous system

Abstract: Ozone (O₃) is a component of photochemical smog, which is a major air pollutant and demonstrates properties that are harmful to health because of the toxic properties that are inherent to its powerful oxidizing capabilities. Environmental O₃ exposure is associated with many symptoms related to respiratory disorders, which include loss of lung function, exacerbation of asthma, airway damage, and lung inflammation. The effects of O₃ are not restricted to the respiratory system or function – adverse effects within the central nervous system (CNS) such as decreased cognitive response, decrease in motor activity, headaches, disturbances in the sleep-wake cycle, neuronal dysfunctions, cell degeneration, and neurochemical alterations have also been described; furthermore, it has also been proposed that O₃ could have epigenetic effects. O₃ exposure induces the reactive chemical species in the lungs, but the short half-life of these chemical species has led some authors to attribute the injurious mechanisms observed within the lungs to inflammatory processes. However, the damage to the CNS induced by O₃ exposure is not well understood. In this review, the basic mechanisms of inflammation and activation of the immune system by O₃ exposure are described and the potential mechanisms of damage, which include neuroinflammation and oxidative stress, and the signs and symptoms of disturbances within the CNS caused by environmental O₃ exposure are discussed.

Keywords: air pollution; central nervous system; inflammation; oxidative stress; ozone.

*Corresponding author: Carlos Paz, Departamento de Neurofisiología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS Insurgentes Sur 3877, CP 14269 México, DF, México, e-mail: paztres@unam.mx

Juan Carlos Martínez-Lazcano, Edith González-Guevara, María del Carmen Rubio, Javier Franco-Pérez, Verónica Custodio, Miguel Hernández-Cerón and Carlos Livera: Departamento de Neurofisiología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS Insurgentes Sur 3877, CP 14269 México, DF, México
Edith González-Guevara and Carlos Livera: Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, CP 04510 México, DF, México

Miguel Hernández-Cerón: Posgrado en Ciencias Farmacológicas, Universidad Autónoma Metropolitana, Calzada del Hueso 1100, CP 04960 México, DF, México

Introduction: systemic consequences of ozone exposure on health

Atmospheric pollution represents a serious health problem, particularly in developing countries where millions of people are chronically exposed to air pollutants (Paz, 1997; Block and Calderon, 2009). Ozone (O₃), particulate matter (PM), and various biological materials are the main air pollutants that we breathe and that can cause severe health damage. It is estimated that air pollution is the eighth highest mortality risk factor, accounting for 2.5% of all deaths in developed countries (Narayan et al., 2010). Additionally, an increase in the admission of people into hospitals, which is reflected by loss in labor productivity, because of O₃ pollution has been reported (Jörres et al., 1996; Frank et al., 2001; Szyszkowicz et al., 2009).

O₃ can be naturally generated by the photodissociation of ultraviolet rays from the sun at low wavelengths on oxygen molecules (O₂) in the lower atmosphere. O₃ can also be formed by high-voltage discharges from engine friction, neon light signs, and other electrical equipment such as xerographic copiers, electrostatic air cleaners, printers, and workplaces where welding is used. Moreover, O₃ is generated and used in the purification of air systems in buildings, in the control of fungal and bacterial growth in cold storage plants, in the treatment of residual waters, and in the purification of drinking water.

The World Health Organization (WHO, 2005), in its document WHO Air Quality Guidelines for Particulate Matter, Ozone, Nitrogen Dioxide and Sulfur Dioxide, established the permissible limits of O₃ exposure at an average of 120 µg/m³ (60 ppb) for a maximum of 8-h concentration. However, diminished pulmonary function