



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

EFFECTOS Y MECANISMOS DE DROGAS
ANTICONVULSIVANTES EN MODELOS
EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA IN VIVO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. GABRIELA MORA RIVAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. RICARDO TAPIA IBARGÜENGOYTIA

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia y con el apoyo de la beca del CONACYT: 185211.

Miembros del Comité Tutorial:

Dra. Herminia Pasantes

Dra. Clorinda Arias

Dr. Ricardo Tapia

D e d i c a t o r i a

A René Ortiz Fernández de Lara, quien sin duda forma parte fundamental en este logro profesional e indiscutiblemente, en mi vida...

A mis padres César y María del Consuelo con amor, admiración y respeto, por que hoy se que el trabajo no es solo lo que uno hace, sino lo que uno es.

A mis hermanos: Cecilia, Alejandra, Daniela y César, por ser para mi fortuna, un motor cuando el mundo me queda grande y una fuente inagotable de emociones de las que aprendo cada día.

A la Universidad Autónoma de México
"Por mi raza hablará el espíritu"

A María Pons Peris, en memoria.

Agradecimientos

Al Dr. Ricardo Tapia por permitirme un espacio para el desarrollo de este proyecto, así como por sus enseñanzas, apoyo y paciencia.

A los miembros de mi comité tutorial por sus valiosas aportaciones y tiempo invertido: Dr. Ricardo Tapia, Dra. Herminia Pasantes y Dra. Clorinda Arias.

A los miembros del jurado por contribuir al presente, con sus observaciones y revisión:

Dr. Fernando Peña

Dr. Iván Velasco

Dra. Clorinda Arias

Dra. Herminia Pasantes

Dr. Ricardo Tapia

A mis compañeros de laboratorio por compartir su conocimiento y los tantos momentos: Gabriela Vera, Luis Bernardo Tovar y Romo, Xochitl Ayala, Patricia Salazar, Angélica Zepeda, Marina Ortiz, Juan Carlos Corona, Beatriz Jiménez y Nadia Ramírez.

A Luis y a Gaby por su impulso incondicional *"...Y por que no importa a donde vayamos, ni el camino que tomemos, siempre nos llevamos algo de cada quien"*.

A Teresa Montiel y a Federico Jandete, por ayudar a llevar a cabo este trabajo.

A mis amigos:

Iván Espinosa, Jorge Fragoso y Verónica Ontiveros, por sus acertados consejos y su importante presencia capaz de aligerar cualquier carga.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Transmisión sináptica	6
1.2 La sinapsis glutamatérgica	9
1.3 El glutamato y la excitotoxicidad	11
2. ANTECEDENTES	13
2.1 La epilepsia	13
2.2 La 4-aminopiridina	16
2.3 Neurodegeneración	18
2.4 Los canales de potasio y la retigabina	20
2.5 La minociclina	24
3. OBJETIVOS	28
4. MATERIAL Y MÉTODO	29
4.1 Microdiálisis	29
4.2 Cirugía	29
4.3 Registro electroencefalográfico	30
4.4 Observación conductual	31
4.5 Drogas	31
4.6 Análisis histológico	33
4.7 Análisis estadístico	34

5. RESULTADOS	35
5.1 La 4-AP y la retigabina	35
5.1.1 Efecto conductual	35
5.1.2 Administración de la 4-AP por microdiálisis y retigabina intraperitoneal	37
5.1.3 Actividad EEG	37
5.1.4 Neurodegeneración	40
5.1.5 Glutamato extracelular	43
5.1.6 Administración por microdiálisis de la 4-AP y la retigabina	45
5.1.7 Actividad EEG	45
5.1.8 Neurodegeneración	49
5.1.9 Glutamato extracelular	53
5.2 La 4-AP y la minociclina	55
5.2.1 Neurodegeneración	55
5.2.2 Glutamato extracelular	57
6. DISCUSIÓN	59
6.1 Retigabina	59
6.2 Minociclina	65
7. CONCLUSIONES	70
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

RESUMEN

La epilepsia es un padecimiento en el cual se producen descargas excesivas de neuronas capaces de propagarse en distintas zonas del cerebro y de esta forma provocar crisis convulsivas generalizadas. Hasta ahora la hipótesis más aceptada acerca de la generación de esta alteración, se atribuye a un desequilibrio entre la neurotransmisión inhibitoria y la excitadora, la primera mediada por el ácido γ -aminobutírico (GABA) y la segunda por el ácido glutámico. Este desequilibrio, ya sea por el decremento en la transmisión GABAérgica o un incremento en la transmisión glutamatérgica, ha sido asociado con esta condición patológica tanto en modelos animales como en humanos.

Nuestros antecedentes han mostrado que la estimulación de la liberación de glutamato aumenta la transmisión excitadora y genera epilepsia, por lo que se considera un buen modelo de estudio de este padecimiento en animales. Para ello se administran drogas como la 4-aminopiridina (4-AP) por la técnica de microdiálisis en el hipocampo de la rata in vivo, la cual produce descargas epileptogénicas y neurodegeneración.

Con el fin de buscar nuevas estrategias farmacológicas que nos conduzcan a dilucidar los factores y mecanismos involucrados en el proceso epiléptico, aprovechamos el uso de compuestos probados con éxito en varios modelos experimentales de epilepsia y/o neurodegeneración tanto in vivo como in vitro. Así pues, tomando en cuenta que un efecto primario de la 4-AP es el bloqueo de canales de K^+ , la apertura de canales para este ion podría participar de manera importante en la reducción de la excitabilidad neuronal y perfilarse así, como un blanco antiepiléptico.

Por tanto, el objetivo principal de este trabajo utilizando de manera simultánea las técnicas de electroencefalografía, microdiálisis e histología, fue determinar si la retigabina, droga abridora de canales de potasio del tipo KCNQ2/3 cuyo potencial anticonvulsivante ha sido previamente descrito podría contrarrestar los efectos adversos de la 4-AP. Por otro lado, dado que un proceso neurodegenerativo involucra entre otros elementos, una respuesta inflamatoria la cual pudiera en mayor o menor grado incrementar la excitotoxicidad, en este trabajo se utilizó también a la minociclina, fármaco anti-inflamatorio que ha mostrado un papel neuroprotector en diversos paradigmas, como un posible agente neuroprotectivo contra el daño provocado por la 4-AP.

Nuestros resultados mostraron que la perfusión de retigabina por microdiálisis es capaz de prevenir el daño neuronal inducido por 4-AP, sin embargo resultó inefectiva contra la actividad epileptogénica.

Conjuntamente con otra serie de factores que pudieran estar involucrados pensamos que probablemente la apertura de estos canales de K^+ sensibles a voltaje no fue suficiente para contribuir en la disminución de dichas descargas, además de considerar que el glutamato no es el único factor que interviene en el desarrollo de las crisis y que la acción convulsivante de la 4-AP posee efectos tanto presinápticos como postsinápticos.

La minociclina no logró contrarrestar el daño neuronal, de lo que se infiere que es posible que el tipo de muerte que produce la 4-AP no este mediado por los mecanismos de acción de esta droga y que la inflamación no juegue un papel relevante en el proceso de muerte.

ABSTRACT

Epilepsy is a disorder in which excessive neuronal discharges are produced; these are capable of spreading in different brain zones, and therefore induced generalized seizures. Currently, the most accepted hypothesis regarding the generation of this disorder, is attributed to imbalance between the inhibiting neurotransmission and the excitatory, the first mediated by γ -aminobutyric acid (GABA) and the second one by glutamic acid. This imbalance has been associated with this pathological condition in animal models as in humans, either by decrease in the GABAergic transmission or an increase in the glutamatergic transmission.

Our previous studies have shown the stimulation of the glutamate release increases the excitatory transmission and generates epilepsy, therefore it is considered a good experimental model in this disorder in animals. With this purpose we administer drugs like 4-aminopyridine (4-AP) by the microdialysis perfusion technique in a rat hippocampus in vivo, which produces epileptogenic discharges and neurodegeneration.

In order to research for new pharmacological strategies that drive us to explain the factors and mechanisms involved in the epileptic process, we take advantage of the use of successfully proven compounds in several experimental models of epilepsy and/or neurodegeneration both in vivo as in vitro. Therefore, bearing in mind that a primary effect of the 4-AP is a K^+ channel blocker, the opening of channels for this ion, might participated in an important way in the reduction of the neuronal excitability, and this way be outlined as an antiepileptic target.

Therefore, the main objective of this work using the simultaneously the electroencephalography, microdialysis and histology techniques was to determine if the retigabine, an opener of the KCNQ2/Q3-type K^+ which possesses antiepileptic action that has been previously described, might decrease the adverse effects of 4-AP. On the other hand, provided that a neurodegenerative process involved other elements, an inflammatory response which could increase the excitotoxicity in any level in this study also the minocycline was used, which is an anti-inflammatory drug that has shown a neuroprotective role in diverse paradigms, as a possible neuroprotective agent against damage induced by the 4-AP.

Our results have shown that microdialysis perfusion of retigabine prevents the neuronal damage induced by 4-AP, nevertheless it turned out to be ineffective against epileptiform activity. Together with other series of factors that could be involved, we think that probably the opening of these sensitive voltage K^+ channels was not sufficient to contribute in the decrease of the above mentioned discharges, besides considering that glutamate is not the unique factor that intervenes in the generation of epileptiform

discharges and that the convulsive action of the 4-AP has so many presynaptic as postsynaptic effects.

Minocycline did not manage to decrease neuronal damage, therefore it is inferred that it is possible that the type of death produced by 4-AP is not mediated by the action mechanisms of this drug, and the inflammation does not play a relevant role in the neuronal death process.

ABREVIATURAS

3-NP	ácido 3-nitropropiónico
4-AP	4-aminopiridina
AAE	aminoácidos excitadores
AMPA	α -amino-3-hydroxi-5-metil-isoxazol-4-propionato ácido
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
AQ	ácido quinolínico
CCSV	canales de calcio sensibles a voltaje
DAG	diacil glicerol
EEG	registro electroencefalográfico
GABA	ácido γ -aminobutírico
GLU	glutamato
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
i.p.	intraperitoneal
IL-1β	interleucina 1 β
IP₃	inositol trifosfato
KA	ácido kaínico
KCNQ	canales de potasio dependientes de voltaje
LDH	lactato deshidrogenada
MK-801	maleato de dizocilpina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahydropiridina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
OPA	<i>o</i> -oftaldialdehído
SDH	succinado deshidrogenasa
SE	status epilepticus
SNC	sistema nerviosos central
TNF-α	factor de necrosis tumoral α

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Transmisión sináptica

El término sinapsis fue introducido a principios de este siglo por Charles Sherrington, para describir la zona de contacto especializada en la que una neurona se comunica con otra; zona que ya había sido descrita histológicamente con trabajos de microscopía óptica por Santiago Ramón y Cajal.

Todas las neuronas utilizan una de las dos formas básicas de transmisión sináptica que existen, ya sea eléctrica o química, siendo la misma célula la que cuenta con la capacidad de modular la intensidad de ambas formas de transmisión. En una sinapsis eléctrica, las membranas pre y postsinápticas están en íntima aposición y forman uniones hendidas a través de las que la corriente eléctrica puede fluir directamente de una célula a otra.

En contraste, las sinapsis químicas utilizan una sustancia transmisora con la que la neurona presináptica se comunica con la célula postsináptica y esta comunicación tiene lugar por medio de la hendidura sináptica. La mayoría de las sinapsis en el sistema nervioso son de transmisión química y esta se puede dividir en cuatro etapas fundamentales que se llevan a cabo secuencialmente. La primera comprende la síntesis de la sustancia transmisora, la segunda sucede con el almacenamiento y liberación del transmisor, posteriormente se lleva a cabo la interacción del transmisor con un receptor en la membrana postsináptica y finalmente acontece la eliminación del transmisor de la hendidura sináptica.

Existen también dos clases principales de mensajeros químicos, los transmisores de moléculas pequeñas y los péptidos neuroactivos. Dentro del grupo clasificado como moléculas pequeñas se encuentran la acetilcolina, las aminas biogénicas y los aminoácidos (Kandel, 2001).

La comunicación interneuronal en las sinapsis químicas da inicio por tanto, cuando una neurona emisora genera un potencial de acción como respuesta a estímulos recibidos, y éste es capaz de propagarse a lo largo de su axón hasta la terminal presináptica. Este potencial de acción genera entonces la despolarización de la membrana, ocasionando la apertura de los canales de calcio sensibles a voltaje (CCSV) que se encuentran en zonas activas en las cuales se localizan las vesículas presinápticas que contienen al neurotransmisor previamente sintetizado y almacenado.

Con la entrada y aumento en la concentración del ión calcio estas vesículas se fusionan y en consecuencia se liberan las moléculas del transmisor al espacio sináptico, mecanismo conocido como exocitosis. Una vez liberado el neurotransmisor éste se difunde en una distancia de entre 20 a 40 nm por la hendidura sináptica hasta unirse a los receptores específicos que se encuentran en la postsinapsis. Esta unión activa a los receptores desencadenando otra fase de la comunicación química conocida como recepción.

Una vez que la sustancia neurotransmisora ha activado a sus receptores debe ser eliminado del espacio sináptico, proceso que se lleva a cabo gracias a tres mecanismos principales, ya sea por difusión, por degradación enzimática o por recaptura, siendo probablemente la recaptura el mecanismo más importante de remoción para la mayoría de los neurotransmisores ya que la difusión está restringida a una pequeña fracción del neurotransmisor y la degradación enzimática a sinapsis de acetilcolina y péptidos (Kandel, 2001).

En la actualidad se reconocen la existencia de dos grandes tipos de proteínas con características de receptores de los neurotransmisores, que podemos agrupar en dos grupos: los receptores ionotrópicos y los metabotrópicos. Los primeros constituyen un canal iónico en sí, es decir, varias subunidades forman un agregado macromolecular que contiene un dominio extracelular que forma el receptor del transmisor y otro que abarca toda la membrana y forma un canal iónico.

Después de la unión del neurotransmisor, el receptor sufre un cambio conformacional que da lugar a la apertura del canal. Estos canales son selectivamente permeables para ciertos cationes o aniones, y de esto depende que el resultado de su apertura provoque excitación cuando involucra a canales catiónicos o inhibición cuando afecta a canales aniónicos.

El segundo tipo de receptores actúan modificando las reacciones metabólicas intracelulares que desencadena una serie de reacciones enzimáticas. Estos receptores llamados metabotrópicos están asociados con otra proteína membranal, llamada proteína G, la cual es modificada después de la unión del receptor, y como consecuencia de esta modificación se activan diferentes reacciones bioquímicas (Tapia, 1999).

Los productos de estas reacciones son moléculas conocidas como segundos mensajeros tales como el inositol trifosfato (IP3) el diacil glicerol (DAG) y el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y participan en cascadas de señalización metabólica para la fosforilación o desfosforilación de otras proteínas celulares, incluyendo a los propios canales iónicos (Meldrum, 2000).

Los receptores ionotrópicos y los metabotrópicos tienen funciones diferentes. Mientras que los primeros producen acciones sinápticas relativamente rápidas con duración de milisegundos, los segundos producen reacciones sinápticas más lentas, que duran segundos o minutos. Estas acciones de mayor lentitud permiten regular el comportamiento modificando la excitabilidad de las neuronas y modular la función sináptica (Pasantes y col., 1991; Kandel, 2001).

1.2 La sinapsis glutamatérgica

El glutamato se produce a partir del α -cetoglutarato, un metabolito intermedio en el ciclo del ácido tricarboxílico. Después de su liberación, el glutamato es captado de la hendidura sináptica tanto por las neuronas como por la neuroglía. Posteriormente, este glutamato captado por los astrocitos se convierte en glutamina por la glutamina sintetasa. Esta glutamina se difunde nuevamente a las neuronas que emplean el glutamato como neurotransmisor, en donde de nueva cuenta se vuelve a hidrolizar hacia glutamato. En la terminal sináptica, su principal precursor es la glutamina que se hidroliza por la acción de la glutaminasa dependiente de fosfato, dando como resultado ácido glutámico y amonio (Kandel, 2001; Daikhin e Yudkoff, 2000).

En las sinapsis glutamatérgicas se pueden encontrar varios tipos de receptores, tanto de tipo ionotrópico como metabotrópico. Los receptores ionotrópicos reciben su nombre de acuerdo a su sensibilidad farmacológica, es decir, en función del agonista que los activa con mayor selectividad. Los receptores ionotrópicos a glutamato de tipo NMDA, son aquellos activados por N-metil-D-aspartato y los receptores no NMDA son sensibles al AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionato) o al KA (ácido kaínico). Los receptores AMPA y KA son selectivamente permeables al sodio y potasio, es decir tienen una alta conductancia a estos iones; además se conoce que los receptores del tipo NMDA tienen una alta conductancia al calcio. Los receptores del tipo NMDA a diferencia de los receptores no-NMDA son sensibles al voltaje a través de la membrana (Nakanishi, 1992).

Por otro lado, los receptores metabotrópicos se dividen en tres grupos con base en su estructura molecular y homología de secuencias, mecanismos de transducción y farmacología (Doble, 1999; Vera, 2004; Nakanishi, 1994) (Tabla 1).

	NMDA	MAPA	KAINATO	METABOTRÓPICO
Familia	Canal iónico	Canal iónico	Canal iónico	Unido a proteína-G
Estructura	Oligomérico	Oligomérico	Oligomérico	Monomérico siete domonios transmembranales
Selectividad iónica	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺	Na ⁺ , K ⁺	Na ⁺ , K ⁺	
Agonistas selectivos	NMDA aspartato ácido quinolínic ibotenato	AMPA ácido quisquálico ácido- kaínico	KAINATO domoato	Trans-ACPD ácido- iboténico quisqualato
Antagonistas	Z-APV MK-801 D-AP5	NBQX GYKI52466	CNQX NS 102 SYM2081	Fenilglicinas

Tabla 1. Grupos de receptores ionotrópicos y metabotrópicos a glutamato (Doble, 1999).

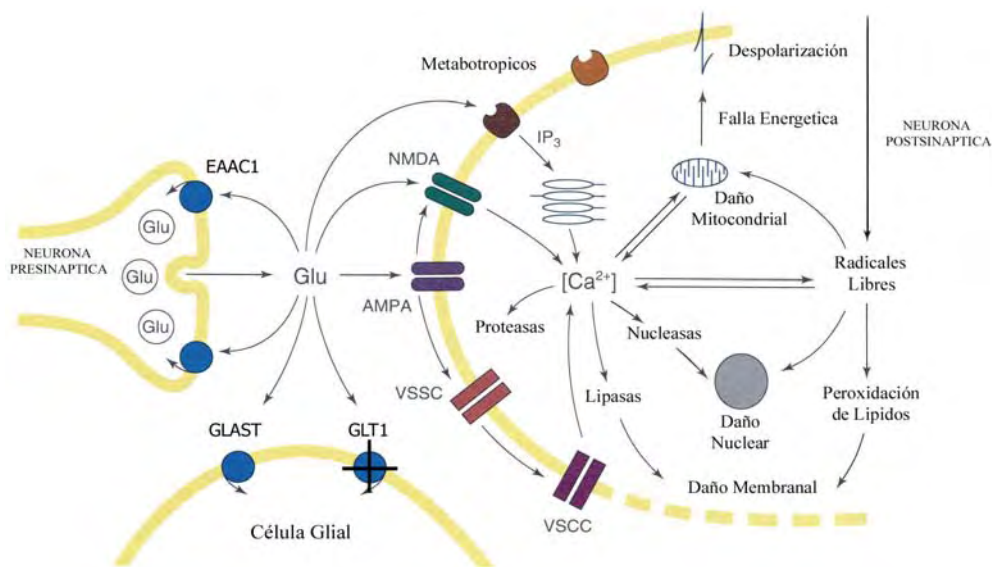


Figura 1. Esquema que ejemplifica una sinapsis glutamatergica. Se muestra que el neurotransmisor es el producto de la síntesis específica de cada neurona y es liberado al medio extracelular, así como las cascadas bioquímicas que participan en el mecanismo de excitotoxicidad en una sinapsis glutamatergica. Receptores: AMPA, NMDA y metabotrópicos. Transportadores: EAAC1, GLAST y GLT1. VSCC: canales sensibles a voltaje. IP₃: inositol trifosfato.

1.3 El glutamato y la excitotoxicidad

Los aminoácidos catalogados como neurotransmisores son el glutamato, el aspartato, el ácido γ -aminobutírico (GABA) y la glicina. Los dos primeros son llamados aminoácidos excitadores (AAE) y los últimos aminoácidos inhibidores, clasificados así, en función de su efecto sobre la probabilidad de disparo de la neurona postsináptica, es decir, un neurotransmisor excitador aumenta la probabilidad de disparo de la neurona postsináptica y un neurotransmisor inhibidor la disminuye (Peña, 2001).

Además de su papel como neurotransmisor, el glutamato puede jugar un papel de endotoxina, refiriéndonos al término excitotoxicidad como el proceso de muerte neuronal que ocurre por la excesiva o prolongada activación de los receptores de AAE (Choi, 1988; Olney e Ishimaru, 1999).

Los primeros datos sobre la acción excitotóxica del glutamato en el cerebro y la médula espinal en mamíferos son de la década de 1950-1960, cuando el grupo de Curtis, describió el efecto despolarizante del ácido glutámico en neuronas de médula espinales de rata, sin embargo, no fue hasta finales de los años setenta que se reconoció al glutamato como el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso de vertebrados (Doble, 1999; Meldrum, 1995).

Los primeros reportes acerca de las propiedades neurotóxicas del glutamato fueron hechas por Lucas y Newhouse en 1957, quienes encontraron que la administración sistémica de glutamato en ratones infantiles causaba lesiones necróticas en la retina de ratas. También se demostró que la administración oral de glutamato en roedores infantiles y primates provocaba una degeneración neuronal en áreas del cerebro que carecían de la barrera hematoencefálica (Bittigau e Ikonomidou, 1997; Olney y col., 1971).

Al aumentar su concentración citosólica, el calcio tiene la capacidad de activar por un lado a las proteasas, como la calpaína, cuyo papel es degradar proteínas estructurales, o como la tubulina o la espectrina, por lo que su acción compromete directamente la sobrevivencia celular.

El Ca^{2+} también activa las fosfolipasas las cuales a su vez contribuyen al rompimiento de la membrana celular y a la consecuente liberación del ácido araquidónico, cuyo metabolismo favorece la producción de radicales libres altamente citotóxicos (Massieu, 1999). Finalmente, este mismo proceso excitotóxico se ve amplificado también por la participación de endonucleasas, encargadas de la degradación de los ácidos nucleicos (Tapia y col., 1999).

Existen además, diversos mecanismos mediante los cuales se genera un daño mitocondrial dependiente de calcio, como la generación de especies reactivas de oxígeno que dan lugar a la formación de radicales libres superóxido, el transporte de este catión al interior de la mitocondria y la consiguiente despolarización de la membrana mitocondrial. Además de todo lo anterior, se ha visto que la activación de los receptores metabotrópicos participa en el incremento de las concentraciones de calcio, ya que el IP_3 estimula su liberación de pozas intracelulares (Mannaioni y col., 2001).

Estos efectos excitotóxicos se manifiestan cuando hay una excesiva transmisión sináptica glutamatérgica, como parece ocurrir en varios desórdenes neurológicos como la epilepsia.

2. ANTECEDENTES

2.1 La epilepsia

La epilepsia ha sido uno de los grandes problemas de la humanidad, tanto por su alta prevalencia e incidencia, como por sus consecuencias médicas y sociales. En varios periodos de la historia ha sido vista como signo de castigo o motivo de persecución, de hechizo, de posesión diabólica o como una enfermedad contagiosa. Etimológicamente, la palabra epilepsia deriva de una preposición y de un verbo irregular griego, *epilambanein*, que significa: “ser sobrecogido bruscamente” (Brailowsky, 1997).

El término epilepsia se refiere a un conjunto heterogéneo de trastornos neurológicos crónicos que representan una reacción anormal del cerebro a ciertos tipos de agresión. La agresión puede estar dirigida al cerebro mismo o puede ser secundaria, desarrollada por alteraciones de origen genético, metabólico, o postraumáticas, ya sea posterior a un daño perinatal o a un traumatismo cráneo-encefálico. Estos son unos de los principales factores etiológicos que se sincronizan con los factores neuroquímicos, y que dan como resultado final las alteraciones electroencefalográficas y manifestaciones clínicas de esta afección (Velasco y col., 1997).

La manifestación clínica de la epilepsia son las crisis epilépticas. El término crisis, se refiere a una alteración súbita y transitoria de la actividad cerebral causada por la descarga incontrolada, rítmica y sincrónica de grandes poblaciones neuronales. Esta descarga neuronal anormal se manifiesta clínicamente, según el área cerebral afectada, como un conjunto variado de alteraciones motoras, sensoriales, autonómicas o psíquicas, que pueden o no acompañarse de alteración de la conciencia (Contreras, 2000).

Pese a que existen muchas clasificaciones de epilepsia, en la actualidad se separa este padecimiento en dos grupos: epilepsia parcial y epilepsia generalizada.

La epilepsia parcial se origina en un pequeño grupo de neuronas que se encuentran constituidas en un “foco epiléptico” y de esta manera la sintomatología dependerá de la región en donde se encuentre el foco epiléptico, mientras que la epilepsia generalizada involucra a toda la corteza cerebral desde su inicio, aunque no se puede descartar la presencia de un foco epiléptico (Peña, 2001).

El modelo animal que se emplea en el presente trabajo puede ser considerado como un modelo de epilepsia parcial, pues se induce un foco epiléptico en el hipocampo que eventualmente produce crisis convulsivantes por la propagación de la actividad epiléptica a la corteza cerebral.

El hipocampo es una elevación curva de sustancia gris que se extiende a lo largo de la base del asta inferior del ventrículo lateral y forma parte del sistema límbico; es una estructura sumamente susceptible a la actividad convulsiva, la cual puede propagarse hacia otras estructuras de este sistema. Los somas de las neuronas piramidales del hipocampo se encuentran alineados en una hilera formando una C, área a la que se le denomina cuerno de Amón y en el que se pueden distinguir las regiones de CA1, CA2, CA3 e hilus (Figura 2) (Kandel, 2001).

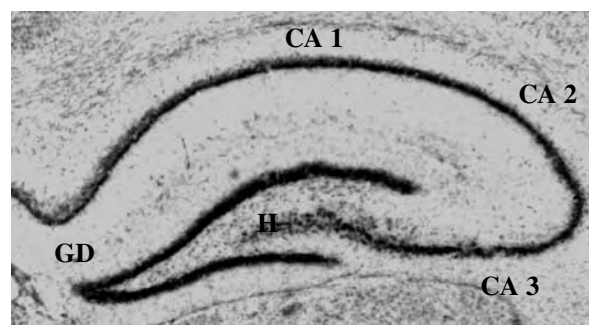


Figura 2. Sección histológica de un corte transversal de una rata control. De acuerdo a su morfología, las células piramidales que comprende la formación del hipocampo, se han dividido en tres regiones designadas (CA1, CA2 y CA3) además del giro dentado (GD) y el Hilus (H) (Johnston y Amaral, 1998).

La actividad eléctrica generada por el cerebro vivo puede ser registrada gracias al electroencefalograma, aplicación que cambió drásticamente el estudio de la epilepsia.

El EEG es en sí, el registro gráfico en el tiempo de los potenciales eléctricos que se generan en el espacio extracelular como consecuencia del flujo de corrientes eléctricas entre el interior y el exterior de una célula durante la actividad neuronal. Éste es considerado un método no invasivo ya que registra pasivamente la actividad generada de forma natural mediante sensores adecuados como lo son los electrodos (Hernández-Collados y Sánchez-Turet, 1997).

Pese a que el origen de la epilepsia hasta nuestros días sigue siendo desconocido, una de las hipótesis más sólidas que explican el origen de la epilepsia es la de cierto desequilibrio entre la neurotransmisión inhibitoria y la excitadora en alguna región cerebral, desorden que posiblemente tiene origen en la disminución de la actividad inhibitoria GABAérgica, en el aumento de la actividad del ácido glutámico o en la combinación de ambos factores.

Esta postulación se sustenta por diversos hallazgos observados tanto en modelos animales como en humanos (Bradford, 1995; Meldrum, 1995), además del gran número de evidencias que indican la ya mencionada e importante participación del ácido glutámico en la epilepsia.

2.2 La 4-aminopiridina

La 4-aminopiridina (4-AP), es un bloqueador específico de las corrientes de potasio que ha sido ampliamente utilizado como un agente farmacológico en diversos estudios sobre los canales de K^+ , mecanismos de epileptogénesis y plasticidad sináptica (Thesleff, 1980).

La 4-AP es un bloqueador de los canales de K^+ de amplio espectro que suprime preferentemente a las corrientes de K^+ transitorias, es decir, aquellas que son activadas rápidamente e inactivadas aún en presencia del estímulo despolarizante. Estas corrientes son denominadas de tipo A (I_A) y tipo D (I_D) (Storm, 1993) y se ha observado que el bloqueo de estas corrientes por la 4-AP puede prolongar la fase despolarizante del potencial de acción e inducir disparo repetitivo de las neuronas (Bargas y col., 1989; Hoffman y col., 1997). Sin embargo, aunque con diferente potencia, puede bloquear todos los canales de potasio (Chandy y Gutman, 1995; Dolly y Parcej, 1996).

La 4-AP, es una droga que produce epilepsia y convulsiones tanto *in vitro*, en rebanadas de cerebro (Gean, 1990; Avoli y col., 1996; Peña y col., 2002) e *in vivo*, en la rata (Fragoso-Veloz y Tapia, 1992; Morales-Villagrán y col., 1996; Peña y Tapia, 1999b, 2000), en el ratón (Yamaguchi y Rogawski, 1992;) e inclusive en el humano (Spyker y col., 1980).

Este efecto convulsivante se ha relacionado por un lado, con el aumento en la liberación de neurotransmisores excitadores, desde las terminales sinápticas (Tapia y Sitges, 1982; Versteeg y col., 1995; Morales-Villagrán y Tapia, 1996; Peña y Tapia, 2000, Salazar y col., 2003) y por otro, múltiples trabajos evidencian que la sobreactivación de los receptores a glutamato se encuentra involucrada al menos en parte en este efecto, dado que el bloqueo con antagonistas de los receptores NMDA y no-NMDA resultan ser eficaces anticonvulsivantes contra la actividad epileptiforme producida por la 4-AP (Fragoso-

Veloz y col., 1990; Fragoso-Veloz y Tapia, 1992; Medina-Ceja y col., 2000; Peña y Tapia, 2000; Ayala y Tapia, 2003) (Figura 3).

Tomando en cuenta que la 4-AP impide la repolarización del potencial de acción y con esto estimula la transmisión sináptica al producir la excitabilidad de las neuronas, su aplicación ha sido considerada como un buen modelo de estudio en el padecimiento de la epilepsia. Por ello, en el presente trabajo se administró 4-AP en el hipocampo de rata para inducir la generación de descargas epileptogénicas y neurodegeneración al aumentar la concentración extracelular de glutamato (Peña y Tapia, 1999b, 2000).

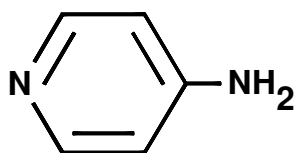


Figura 3. Estructura química de la 4-aminopiridina

2.3 Neurodegeneración

Las enfermedades neurodegenerativas comprenden un grupo de desórdenes neuronales que resultan en una pérdida progresiva y severa de las funciones cognitivas y motoras durante el periodo medio o tardío de la vida. En este tipo de padecimientos sucede la muerte neuronal con un patrón selectivo de grupos de neuronas, y en todos los casos la aparición de la muerte celular en subpoblaciones específicas no tiene una explicación aceptada, sino que existen varias teorías acerca de la patogénesis de cada condición y los eventos que desencadenan la muerte (Mehler y Gokhan, 2001). Entre estos padecimientos se encuentran la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Huntington.

Tanto en la epilepsia como en diversos padecimientos neurológicos, se ve involucrada una marcada destrucción de neuronas que se traduce en distintas alteraciones neurológicas y conductuales dependiendo del área afectada. La epilepsia es una condición en el cual se puede presentar la muerte neuronal precedida de crisis epilépticas recurrentes (Pitkänen, 2002).

En trabajos de nuestro laboratorio, citados anteriormente, se encontró que la administración de 4-AP en el hipocampo por medio de microdiálisis incrementa el glutamato extracelular liberado desde las terminales presinápticas, induce crisis epileptiformes y una marcada neurodegeneración. Así mismo, se demostró que el daño neuronal provocado por la 4-AP es causado al menos en parte, por la sobreactivación de los receptores a glutamato del tipo NMDA (Peña y Tapia, 2000).

El daño neuronal producido por la 4-AP, sigue un patrón muy característico, en el cual se presenta una marcada vulnerabilidad de las zonas de CA1 y CA3, mientras que CA2 y giro dentado son resistentes.

Esta selectividad física se explica por una expresión diferencial de receptores a glutamato o por la presencia de proteínas que capturan calcio, factores que resultan ser de suma importancia en la muerte neuronal excitotóxica (Baimbridge y Miller 1982; Muñoz, 1990; Grooms y col., 2000).

Con el objeto de probar estrategias de protección eficaces contra la neurodegeneración se han empleado distintas herramientas terapéuticas en modelos animales. Una de las más estudiadas ha sido el bloqueo de los receptores a glutamato (Meldrum, 1991; Peña y Tapia, 2000) fundamentada en la hipótesis que plantea que la generación del daño neuronal en el caso de la epilepsia, podría estar mediado por una sobreactivación glutamatérgica. Sin embargo, pese a sus efectivos resultados en modelos animales, en la clínica, los antagonistas de receptores a glutamato conocidos juegan un importante papel en numerosas funciones del sistema nervioso central y tienen efectos colaterales adversos (Klein y col., 1999).

2.4 Los canales de potasio y la retigabina

La mayoría de las drogas antiepilépticas comúnmente utilizadas se pueden catalogar en tres clases farmacológicas; las que modulan los canales de sodio sensibles al voltaje, las que modulan la neurotransmisión GABAérgica inhibitoria y las que ejercen sus efectos por la interacción con la apertura de canales de voltaje dependientes de calcio.

Sin embargo, aunque estas drogas son eficaces en muchos casos, se estima que en más del treinta por ciento de éstas, los efectos no son satisfactorios para los pacientes o bien, provocan consecuencias secundarias no deseadas. Más recientemente, uno de los mecanismos también considerados como antiepilépticos que no ha sido tan ampliamente explotado, es la apertura de canales de potasio.

Los canales de potasio constituyen una familia muy diversificada de canales iónicos que actúan de manera precisa en el control o modulación de varias funciones tanto fisiológicas como fisiopatológicas (Brown e Yu, 2000).

Dentro de los canales de potasio se encuentran los regulados por voltaje (Kv) los cuales participan tanto en el potencial de reposo de la membrana como en la duración y la frecuencia del potencial de acción, además de la liberación de neurotransmisores y la respuesta a los impulsos sinápticos. Estos canales son activados por la despolarización y contribuyen de manera importante en el control de la excitabilidad neuronal (Rudy, 1999; Pongs y col., 1999; Wickenden, 2002).

Tal es el caso canales de potasio del tipo KCNQ que activan corrientes M (I_{KM}), las cuales participan en la regulación de la excitabilidad neuronal en el SNC. De hecho, se ha probado que la supresión de estas corrientes M, resulta en la despolarización de la

membrana y el incremento de la resistencia del impulso neuronal lo que provoca que las células sean más susceptibles a la generación del potencial de acción y con ello a la liberación de neurotransmisores (Rogawski, 2000; Jentsch, 2000; Wang y col., 1998; Brown e Yu, 2000).

Aunado a lo anterior, las mutaciones en los canales de K^+ , particularmente los del tipo KCNQ2/Q3, mismos que son expresados de manera predominante en el sistema nervioso central y se encuentran en regiones cerebrales tanto pre como post sinápticas (Cooper y col., 2000, 2001), han sido propuestas como una de las principales causas probables de ciertos tipos de epilepsia como es el caso de la epilepsia familiar benigna neonatal (Brown e Yu, 2000; Wang y col., 1998; Leppert y Singh, 1999; Biervert y col., 1998; Rogawski, 2000).

Tomando en cuenta que las funciones primordiales de los canales de K^+ son reducir la excitabilidad neuronal, la posibilidad de facilitación de la apertura de estos canales puede representar una potente estrategia neuroprotectiva que recientemente ha sido observada por algunos grupos (Wickenden, 2002; Jentsch, 2000; Rogawski, 2000) y contribuir en el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la hiperexcitabilidad, como en el caso de la epilepsia.

La retigabina [ácido ester etil N-2-amino-4-(4-fluorobencilamino) fenil carbámico] (Figura 4), es un abridor de canales de potasio del tipo KCNQ2/Q3 tanto en neuronas como en células PC12 (Rundfeldt, 1997, 1999; Rundfeldt y Netzer, 2000a; Main, 2000; Tatulian y col., 2001; Wickenden, 2002). Posee propiedades anticonvulsivantes en varios modelos de epilepsia in vivo (Kapetanovic y Rundfeldt, 1996), incluyendo el kindling en la amígdala (Tober y col., 1996), el electrochoque, el modelo con pentilene tetrazol y la picrotoxina (pero no la bicuculina) (Rostock y col., 1996), así como también en dos modelos genéticos de epilepsia, las crisis audiogénicas en ratones DBA/2J y en el modelo genético de epilepsia en ratas (Dailey y col., 1995, De Sarro y col., 2001).

Distintos estudios in vitro, han mostrado también, que la retigabina protege contra la actividad epileptiforme en el modelo de bajo Ca^{++} y bajo Mg^{++} (Dost y Rundfeldt, 2000) y contra los eventos eléctricos tipo crisis, inducidos por la 4-AP en rebanadas de hipocampo y corteza entorrinal (Armand y col., 1999, Yonekawa y col., 1995). La retigabina también es capaz de reducir el disparo repetitivo producido por la inyección de corrientes despolarizantes e induce la hiperpolarización neuronal (Hetka y col., 1999).

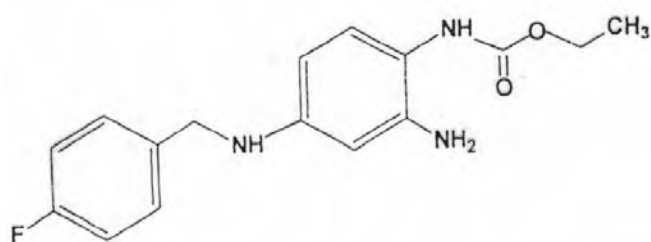


Figura 4. Estructura química de la retigabina

Actualmente se ha considerado que los canales de potasio son los nuevos blancos en el tratamiento de la epilepsia (Rogawski, 2000). La retigabina es un fármaco que cumple con esta propiedad. Además el espectro de actividad anticonvulsivante observada por su aplicación en diversos modelos animales, es comparable con la batería de drogas comúnmente utilizadas para el tratamiento de la epilepsia en humanos como es el caso del valproato, sin embargo, resulta interesante recalcar que la retigabina comparativamente ejerció una mayor efectividad a dosis más bajas respecto a las demás drogas (Tober y col., 1996; Rostock y col., 1996).

Aunado a lo anterior se ha visto que en rebanadas de hipocampo la retigabina fue la única droga que logró suprimir las descargas inducidas por la 4-AP (Yonekawa y col., 1995) mientras que el valproato no solo resultó inefectivo en este modelo sino que la retigabina sí fue capaz de abolir las descargas espontáneas de tipo interictal en las áreas

de CA1 y CA3, además de eliminar la población de espigas generadas después de las descargas inducidas por la 4-AP.

Más aún, en dos modelos de rebanadas de cerebro en los cuales se probaron drogas resistentes a las descargas epileptiformes, la retigabina en comparación con la carbamacepina, el valproato y con la vigabitrina entre otras, fue la única capaz de suprimir dicha actividad dependiente de la concentración (Brückner y Heinemann, 2000).

Cabe mencionar que pese a que se ha visto que este compuesto posee un amplio espectro anticonvulsivante tanto en modelos in vivo como in vitro, y a que recientemente se encuentra en la fase II de la clínica, el mecanismo de acción por el cual ejerce su papel protector hasta la fecha se desconoce.

Sin embargo, las propiedades a las cuales se le atribuye su potencial anticonvulsivante han sido descritas por numerosos trabajos que señalan en primer plano, su efecto de apertura de canales de K^+ (Wickended y col., 2000), por otro lado también puede potenciar la neurotransmisión GABAérgica a través del incremento en la liberación de los niveles de GABA recién sintetizado (Kapetanovic y col., 1995) y finalmente la retigabina puede reducir las corrientes de Na^+ y Ca^{++} a altas concentraciones (Rundfeldt y col., 1995).

De estos datos se desprende el hecho de que la retigabina, droga cuya capacidad comprende la apertura de canales abridores de K^+ , pueda ejercer una acción protectora contra la epilepsia y la neurodegeneración inducida por la acción excitotóxica mediada por la liberación de glutamato que provoca la 4-AP en el hipocampo de la rata in vivo. Este es uno de los objetivos de la presente Tesis.

2.5 La minociclina

El proceso inflamatorio parece participar de manera importante en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas crónicas que se han venido mencionando en esta tesis (Morimoto y col., 2002; Ekdahl y col., 2003). La neurodegeneración causada por inflamación involucra la activación de las células del sistema inmune y con ello se produce la aparición de un gran número de factores proinflamatorios.

Sin embargo, cuando se inicia una respuesta inmune, las células de la microglía que actúan en eventos inflamatorios liberan como defensa factores pre-inflamatorios y citotóxicos, como la interleucina 1- β , el factor de necrosis tumoral $-\alpha$ (TNF- α) y el óxido nítrico (NO). Al mismo tiempo, se generan los radicales libres, el peróxido de hidrógeno, y los metabolitos de los ácidos grasos como los eicosanoides y el ácido quinolinico entre otros, que al participar de manera prolongada pueden desencadenar condiciones adversas en la célula (Tikka y col., 2001a; Liu y Hong, 2003).

En el entendido de que la inflamación por sí misma no es suficiente para producir neurodegeneración aguda in vivo, el grupo de Morimoto (2002), muestra que la inflamación sin embargo, si puede ser capaz de incrementar la excitotoxicidad en el hipocampo de la rata in vivo. Por ello, diversos grupos de trabajo han considerado a la inflamación como un buen blanco farmacológico, dado que ésta sucede de manera progresiva después de una lesión, hecho que abre un abanico de tiempo en la que es posible intervenir con agentes anti-inflamatorios que minimicen o detengan la aparición de eventos neurotóxicos causados por la activación de las células del sistema inmune, sin comprometer las funciones fisiológicas del cerebro (Yrjänheikki y col., 1998, 1999; Liu y Hong, 2003).

Diversos trabajos han asociado ya, el papel que desempeña la glía en la muerte neuronal excitotóxica inducida por glutamato, el cual es capaz de activar a los astrocitos y a la microglía (Tika y col., 2001b), paralelamente al incremento de la liberación de la interleucina 1- β (IL-1 β) y la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Por ello, es importante resaltar que los compuestos con la habilidad para inhibir la activación de microglía o con propiedades anti-inflamatorias podrían representar atractivos fármacos con potencial terapéutico. Entre ellos se encuentra la minociclina, antibiótico derivado de la tetraciclina (Noble y col., 1967) (Figura 5), la cual posee una actividad anti-inflamatoria y a la que se le ha utilizado durante mucho tiempo en la clínica para el tratamiento de distintas enfermedades tanto crónicas como agudas, tales como la artritis reumatoide, la osteoartritis y el acné, entre otras (Amin y col., 1996; Du y col., 2001; Blum y col., 2004), mismas en las que se ha descrito una buena tolerancia en el humano.

La minociclina atraviesa eficientemente la barrera hematoencefálica, presenta una rápida absorción y una excelente penetración en el tejido, no altera la glucosa en plasma, ni afecta la temperatura, ni tampoco la presión arterial (Yrjäneikki y col., 1998) y se le ha empleado con éxito como neuroprotector en diversos modelos experimentales de neurodegeneración tanto in vitro como in vivo (Chen y col., 2000; Du y col., 2001; Tikka y col., 2001b; Xu y col., 2004; Domerq y Matute, 2004).

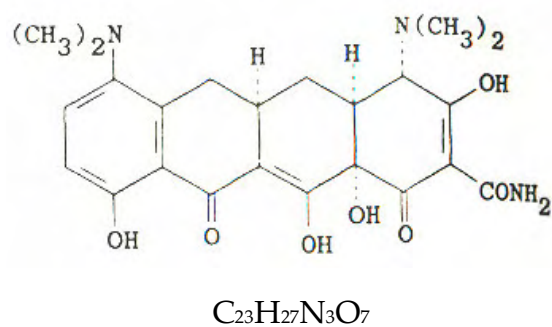


Figura 5. Estructura química de la minociclina

Yrjänheikki y col. (1998), observaron que el pretratamiento con minociclina en un modelo de isquemia cerebral global en gerbos incrementó en un 77% la sobrevivencia de neuronas hipocampales respecto a los gerbos no tratados gracias a la inhibición de la microglia y a la reducción de caspasas.

Otros datos que apuntan en esta misma dirección, indicaron que en cultivos primarios de médula espinal, la minociclina a concentraciones micromolares protegió contra la neurotoxicidad provocada de manera dosis-dependiente por el glutamato y kainato a través de inhibir la activación y proliferación de microglía, la cual precede a la muerte neuronal (Tikka y col., 2001b).

Además, el pretratamiento con concentraciones nanomolares de minociclina fue capaz de proteger contra la excitotoxicidad inducida por NMDA, el cual cuando es administrado solo en cultivos, induce un incremento en la producción de óxido nítrico, de IL-1 β y la proliferación de microglía (Tikka y Koistinaho, 2001a).

El mecanismo de acción por medio del cual la minociclina ejerce su papel neuroprotector aún es desconocido. Sin embargo, distintos grupos lo han atribuido a la capacidad de la minociclina para inhibir la expresión de las caspasas, entre las que se encuentran la 1 y la 3, efecto que en consecuencia, logró retardar la mortalidad en un modelo de ratones transgénicos con la enfermedad de Huntington (Chen y col., 2000) y en la lesión traumática cerebral en ratones (Sanchez y col., 2001).

Además de lo anterior, se ha mostrado que la minociclina produce la inhibición de la liberación del citocromo C de la mitocondria en un modelo de esclerosis lateral amiotrófica (ALS) en ratones (Zhu y col., 2002) y retarda la progresión de la ALS en ratones que expresan la mutación de la enzima SOD1 G37R humana (Kriz y col., 2002).

También se ha observado que la minociclina en cultivos celulares y organotípicos de ratones y en cartílago humano afectado por osteoartritis es capaz de suprimir la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa (ONS), la cual tiene una participación directa en la inflamación y en la destrucción del tejido (Amin y col., 1996).

Con estos antecedentes se consideró interesante estudiar la posible protección de la minociclina contra la excitotoxicidad de la 4-AP en el hipocampo in vivo. Este es el segundo objetivo de la presente tesis.

3. OBJETIVOS

- En base a los estudios previos citados en los antecedentes, el objetivo central de este trabajo es determinar si la retigabina es capaz de proteger contra la neurodegeneración y las descargas epileptiformes provocadas por la 4-AP.
- Conocer el efecto de la retigabina sobre la liberación de glutamato extracelular y otros aminoácidos inducidos por la 4-AP en el hipocampo de rata in vivo.
- Establecer si existe una correlación entre la neuroprotección y la actividad anticonvulsivante de la retigabina contra los efectos de la 4-AP.
- Determinar si la minociclina resulta eficiente para contrarrestar la neurodegeneración que acontece en nuestro modelo de muerte provocada por 4-AP.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 Microdiálisis

Para realizar los experimentos se utilizó la técnica de microdiálisis, la cual consiste en implantar directamente en el tejido intacto de alguna zona específica de animales vivos anestesiados o despiertos en libre movimiento, una cánula de microdiálisis (Figura 6-A). Esta estructura se encuentra rodeada de una membrana de diálisis permeable cuyo material es inerte y permite equilibrar el medio interno con el espacio extracelular. Con esta técnica es posible aplicar cualquier tipo de sustancia exógena capaz de atravesar la membrana, debido a que la permeabilidad de ésta hace factible la difusión de mayor a menor concentración a través de ella. Así mismo, la técnica permite caracterizar eventos fisiológicos en un mismo animal durante horas de manera continua (Rocha, 1997).

4.2 Cirugía

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 240-250g, las cuales fueron anestesiadas con halotano en una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂ y se montaron en aparato esterotáxico, con una almohadilla isotérmica a 37° C (Braintree Scientific, INC), para mantener la temperatura del animal. Una vez anestesiado el animal y mantenido a baja anestesia (0.8-0.6% de halotano) durante todo el experimento, se realizó un corte longitudinal en la piel dejando descubierta la zona del cerebro a fin de introducir la cánula microdiálisis de 2 mm de largo y 0.5 mm de diámetro (previamente lavada con agua destilada por 30 min a un flujo de 15 µl / minuto) hasta el hipocampo dorsal izquierdo en el área media de la región CA1.

De acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1982), las coordenadas para llegar a esta zona del hipocampo corresponden a los valores de: AP -3.6, L +2.4 y V -3.9 mm con respecto a bregma.

Una vez insertada la cánula de microdiálisis en el hipocampo se perfundió continuamente por medio de una bomba de microinyección (CMA 100/Carnegie Medicin) a un flujo de 2 μ l/min una solución Ringer-Krebs compuesta de 118 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 2.5 mM MgSO₄, 4.0 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃ y 10 mM de glucosa (pH 7.4). Después de un periodo de estabilización de 60 minutos, se colectaron continuamente las fracciones de microdiálisis (12.5 min, 25 μ l cada una). Las tres primeras fracciones colectadas se utilizaron para determinar los niveles basales de aminoácidos, la 4-AP (17.5 y 35 mM) se perfundió durante una fracción de microdiálisis y después se continuó la microdiálisis durante seis fracciones más de recuperación. Al final de cada experimento después de retirar la cánula se suturó la piel del animal.

Los aminoácidos colectados en las fracciones de microdiálisis se analizaron cuantitativamente por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como se describe en el trabajo de Salazar y col. (1994). Los 25 μ l de cada fracción se derivatizaron con un volumen igual de *o*-ftaldialdehído (Sigma) en una reacción de 3 min. Una vez transcurrido este tiempo se inyectaron 20 μ l del total de la muestra al cromatógrafo (Beckman). Se utilizó un detector de fluorescencia para la cuantificación de los derivados. Los resultados obtenidos de cada muestra de aminoácidos fueron comparados con los de una mezcla estándar de siete aminoácidos (aspartato, glutamato, glutamina, glicina, taurina, alanina y ácido γ -aminobutírico) procesada de la misma manera.

4.3 Registro electroencefalográfico (EEG)

El registro EEG se llevó a cabo de manera simultánea y continuamente durante toda la microdiálisis (Figura 6-B). La misma cánula de microdiálisis se utilizó como electrodo, después de haber aislado eléctricamente toda la superficie de la cánula mediante un barniz comercial, dejando libre únicamente 1 mm justo arriba de donde se encuentra la

membrana de microdiálisis, con la finalidad de realizar el registro en el hipocampo (Peña y Tapia, 1999b, 2000; Ramírez-Mungía, 2003).

Para el registro EEG se utilizó un polígrafo grass. La señal se filtró dando un ancho de banda entre 3-100 Hz, lo que corresponde a un parámetro de calibración. A partir de los registros obtenidos se determinó la latencia, la frecuencia y la duración de las descargas epileptiformes.

4.4 Observación conductual

Con la finalidad de conocer los efectos conductuales de los animales provocados por la 4-AP y la retigabina en ratas despiertas, estas drogas se administraron sistémicamente a distintas dosis y tiempos. La dosis de 4-AP aplicada de manera intraperitoneal (i.p.) fue de (5 mg/kg) en la cuál se ha reportado una sobre vivencia del 74% de los animales con un 13% de muerte en los mismos (Fragoso-Veloz, 1990). Las dosis utilizadas de retigabina i.p. fueron de (1, 2, 2.5 y 5 mg/kg), que previamente se ha descrito, corresponden a concentraciones bien toleradas tanto en ratas y ratones y con las cuales se ha observado un buen efecto protector (Tober y col., 1996; Rostock y col., 1996). La retigabina se administró a 15, 20, 30, 45 y 60 minutos antes de la aplicación de la 4-AP.

4.5 Drogas

Por la cánula de microdiálisis se perfundió intrahipocamplamente la 4-AP sola (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) disuelta en medio Krebs a una concentración de 17 y 35 mM durante una fracción en el caso de los experimentos control. En un primer grupo experimental, la 4-AP fue coadministrada con la retigabina [ácido ester etil N-2-amino-4-(4-fluorobencilamino) fenil carbámico] disuelta en HCl (0.075 M) (Sills y col., 2000) a una concentración final de 1 mM, dicha concentración fue seleccionada en base a la efectividad que mostró contra la 4-AP en rebanadas de hipocampo (Armand y col., 1999; Yonekawa y col., 1995).

Para el segundo grupo experimental se administró la retigabina sola durante una fracción, posteriormente se perfundió coadministrada con la 4-AP en otra fracción, seguida de dos fracciones más sola. Los controles de retigabina consistieron en la perfusión de ésta droga durante una fracción.

Cabe mencionar que la eficiencia de la cánula de microdiálisis es de alrededor del 10%, como se ha determinado previamente (Morales-Villagrán y Tapia, 1996). La osmolaridad fue mantenida por reducción de la concentración del NaCl proporcionalmente.

Un tercer grupo experimental lo conformaron las ratas previamente tratadas con retigabina i.p. (1 mg/kg) 12, 30 y 60 minutos antes de la perfusión de 4-AP por microdiálisis durante una fracción. Es importante hacer notar que dosis mayores de (2 mg/kg) i.p. de retigabina causaron un efecto tóxico de la droga por sí sola, manifestado por una depresión en el EEG y un posterior paro respiratorio, lo que provocó la muerte en todos los animales.

Otra droga utilizada en este proyecto con fines de neuroprotección fue la minociclina (Sigma). La aplicación de minociclina fue i.p. en todos los animales a una dosis de (100 mg/kg) (Yrjänheikki y col., 1998; Sanchez y col., 2001). El tratamiento con minociclina se dividió en dos grupos de experimentación. Un grupo de ratas fue sometido a un esquema agudo y el otro comprendió un esquema crónico. Al primero de estos se le administró una sola dosis de minociclina una hora antes de la perfusión de 4-AP (35 mM) por microdiálisis durante una fracción en el hipocampo y al otro se les aplicó una dosis de minociclina una vez al día durante tres días previos a la perfusión de 4-AP y otra dosis de minociclina una hora después de la aplicación de la 4-AP.

4.6 Análisis histológico

Al término de 24 horas posteriores al experimento, los animales se anestesiaron con pentobarbital y se perfundieron intracardiamente con 250 ml de NaCl al 0.9%, seguidos de 250 ml de formaldehído al 4% en un buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4.

Una vez extraído el cerebro del animal, se mantuvo en postfijación por un periodo de 24 horas a 4° C y posteriormente se sometió a un gradiente de sacarosa al 10, 20 y 30 % por 24 horas cada uno. Terminado este proceso se realizaron cortes coronales seriados del sitio de la lesión con un grosor de 40 micras en un crióstato y se tiñeron con violeta de cresilo para confirmar la localización correcta de la cánula de microdiálisis en el tejido.

La neurodegeneración se cuantificó con un programa de análisis de imágenes NIH 1.6, contando el número de células sanas en 30,000 μm^2 en un campo de 20 aumentos, bajo el criterio morfológico que considera a una célula muerta por la aparición de un núcleo picnótico y la desaparición del citoplasma y a una célula sana por la presencia de un citoplasma claro, turgente y un soma $>15 \mu\text{m}$. Se analizaron los cortes de tres ratas por cada grupo experimental tomando a su vez para el conteo celular, tres cortes por rata.

4.7 Análisis estadístico

Para cuantificar cambios en la concentración de los aminoácidos y el conteo celular se utilizó la prueba de ANOVA con una t-pareada. El valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

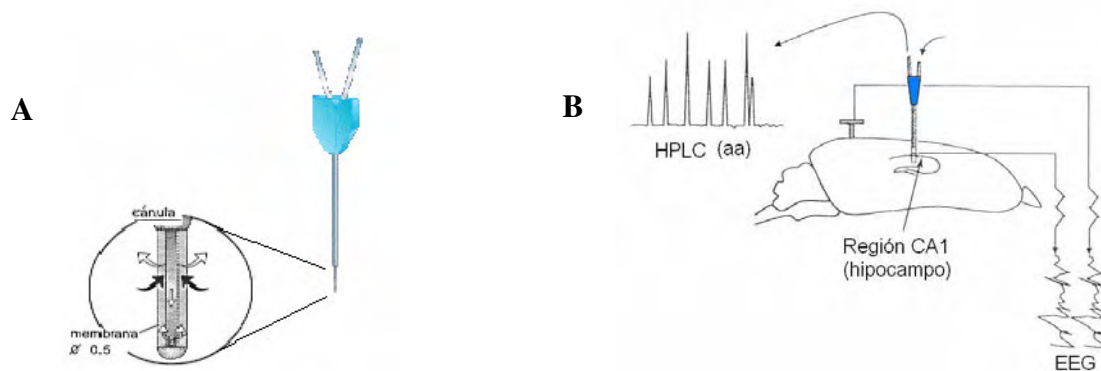


Figura 6. A. Cánula de microdiálisis. Las flechas blancas indican el flujo de perfusión y las negras el flujo de recuperación en la membrana. **B.** Esquema que muestra el del diseño experimental en el cual se utilizó de manera simultánea, la técnica de microdiálisis, el registro EEG y la cuantificación de los aminoácidos por HPLC, tomado de Peña y Tapia, 1999a.

5. RESULTADOS

5.1 La 4-AP y la retigabina

5.1.1 Efecto conductual de la 4-AP y la retigabina

Para conocer si la retigabina era capaz de prevenir o revertir el efecto epileptiforme de la 4-AP en animales despiertos, ambas drogas se administraron intraperitonealmente. Esta evaluación comprendió varias dosis y tiempos de aplicación. Como se muestra en la (tabla 2), la 4-AP a una dosis de (5 mg/kg) produce un efecto epileptogénico bien definido que se manifiesta con movimientos masticatorios, sacudidas de perro mojado, salivación, acicalamiento, movimiento de vibrisas, temblor y en algunos casos giros de barril. Con esta dosis sobrevive más del 74% de los animales.

Las dosis de retigabina (1, 2 y 5 mg/kg) fueron seleccionadas con base en trabajos previos (Tober y col., 1996; Rostock y col., 1996).

Como se puede apreciar en la tabla 3, bajo estas condiciones, de manera general la retigabina no ejerce ningún efecto protector contra el efecto convulsivante de la 4-AP (n=10).

Tiempo y dosis	Efecto conductual
<p align="center">Control de 4-AP 5 mg/kg</p>	<p>Después de 10 minutos después de su aplicación se presentó: Acicalamiento, sacudidas de perro mojado, movimientos masticatorios y de vibrisas, respiración agitada e incremento de la actividad exploratoria, temblor.</p> <p>Alrededor de los 25 minutos: movimientos tónico-clónicos, salivación, sacudidas, erección de la cola y erizamiento del pelo</p> <p>Después de los 60 minutos se aprecia la carrera alrededor de la jaula, la convulsión generalizada y se observó la muerte en el 25% de los animales.</p> <p>Las ratas sobrevivientes presentaron giros de barril y temblor constante.</p>
<p align="center">Retigabina 1 mg/kg 30 min antes de la 4-AP</p>	<p>El comportamiento a esta dosis de retigabina es similar al control de 4-AP tanto en tiempo como en sobrevivencia.</p>
<p align="center">Retigabina 2 mg/kg 30 min antes de la 4-AP</p>	<p>La aparición de todos los efectos producidos por la 4-AP son más tempranos (40 minutos) y se observa la sobrevivencia en el 50% de los animales tratados.</p>
<p align="center">Retigabina 5 mg/kg 30 min antes de la 4-AP</p>	<p>La latencia aparece después de 25 minutos, lo que parece indicar que la retigabina a esta concentración potencia los efectos de la 4-AP.</p>
<p align="center">Controles de retigabina sola 5 mg/kg</p>	<p>Con la aplicación de 5 mg/kg de retigabina se observan pequeñas sacudidas y temblor constante.</p>

Tabla 2. Efecto del pretratamiento con retigabina (1, 2 y 5 mg/kg) sobre la conducta motora producida por la administración sistémica de 4-AP (5 mg/kg) en ratas despiertas. N= 10 animales por grupo.

5.1.2 Administración de la 4-AP por microdiálisis y retigabina intraperitoneal

5.1.3 Actividad EEG

En la figura 7, se observa el efecto de la perfusión de 4-AP (35 mM) y la administración de retigabina (1 mg/kg) i.p. sobre la actividad EEG. En esta se muestran los trazos representativos del registro EEG de ratas anestesiadas, la (figura 7-A) ejemplifica la actividad electroencefalográfica basal de una rata control profundida con medio Krebs, cuyo registro no se ve alterado a través del tiempo y presenta una actividad típica de las ratas anestesiadas (Ramírez-Mungía y col., 2003) (n=3). En la (figura 7-B) se aprecia el patrón de descargas epileptiformes que se observa en el 100% de las ratas profundidas con 4-AP (35 mM) (n=10), el cual se hace evidente después con una latencia de 20 min promedio y se caracteriza por una fase inicial de actividad hipersincrónica que continúa con trenes de espigas de alto voltaje y que ocurren con una duración aproximada de un minuto en promedio.

En la figura (7-C) se muestra el registro EEG de ratas anestesiadas a las cuales se les administró retigabina (5 mg/kg) i.p. Como se puede observar, esta dosis provocó la depresión del registro después de alrededor de 10 minutos de aplicación y fue seguida de un paro respiratorio. Por lo anterior, la dosis única evaluada en estos experimentos se redujo a (1 mg/kg). Con la finalidad de conocer el margen de efecto de la retigabina en el tiempo, esta se inyectó i.p (12, 30 y 60 minutos) antes de la perfusión de 4-AP (35 mM) durante una fracción de microdiálisis.

Los trazos de la (figura 7-D) representan al grupo de animales a los cuales se les aplicó retigabina 12.5 minutos antes de la perfusión de la 4-AP en los cuales no se observó protección contra las descargas epileptiformes en 9 de 12 animales. En la (figura 7-E) se ejemplifica los trazos que mostraron solo 4 animales de 14 cuando fueron tratados con

retigabina 30 minutos antes de la perfusión con 4-AP en los que se observa una reducción en la duración de las descargas epileptiformes.

Este resultado se presentó también en los animales que fueron tratados con retigabina 60 minutos antes de la perfusión de 4-AP (tabla 3) (n=14). Es decir, que de manera general bajo esta condición no encontramos una reducción de la actividad epileptiforme, hecho que se puso de manifiesto en los tres grupos de ratas tratadas con retigabina de forma i.p.

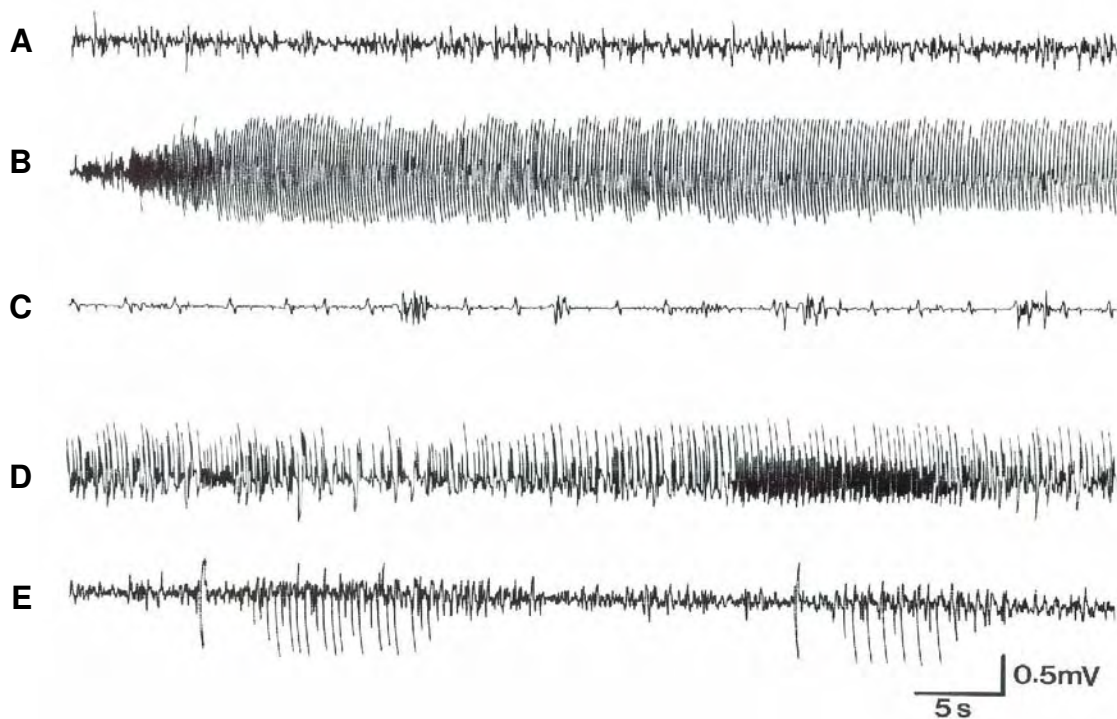


Figura 7. Trazos representativos del efecto de la perfusión de 4-AP (35 mM) en el hipocampo durante una fracción de microdiálisis y la administración de retigabina (1 mg/kg) i.p. sobre la actividad EEG de la rata anestesiada. En **A** se muestra la actividad basal de una rata control profundida con medio Krebs (n=3). **B**, ejemplifica el patrón de descargas que induce la 4-AP (35 mM) (n=10). **C**, muestra la toxicidad encontrada por la aplicación de retigabina (5 mg/kg) i.p. **D**, representa los trazos de animales pretratados con (1 mg/kg) de retigabina 12.5 minutos antes de la perfusión de 4-AP en los cuales no hay protección contra las descargas (n=11). En **E** se aprecia la actividad de los animales en los que la retigabina aplicada 30 minutos antes ofrece un cierto efecto protector (n=3). La latencia de las descargas en **B**, **D** y **E** fue de alrededor de 20 minutos después de la aplicación de 4-AP. En **C**, se observa una depresión de la actividad electroencefalográfica después de 10 minutos de la aplicación de la retigabina (n=3).

Tiempo de pretratamiento con retigabina	Latencia de la primera descarga	Frecuencia (No. de crisis / hr.)	Duración (s)	Neurodegeneración observada en CA1
Controles	23 ± 13.1	14 ± 2.4 Todas las ratas presentan crisis n=10	70 ± 10.2	Todas las ratas presentan daño n=10
12.5 min	28 ± 4.6	15 ± 3.0 9 ratas con crisis 3 con reducción de las crisis n=12	62 ± 18	3 ratas protegidas 15 con daño n=18
30 min	33 ± 5.7	12 ± 1.8 11 ratas con crisis 3 con reducción de las crisis n=14	128 ± 36	4 ratas protegidas 15 con daño n=19
60 min	19 ± 3.2	29 ± 6.2 10 ratas con crisis 4 con reducción de las crisis n=14	53 ± 14.3	3 ratas protegidas 12 con daño n=15

Tabla 3. Efecto del pretratamiento con retigabina (1 mg/kg) a distintos tiempos, sobre la actividad epileptogénica y la neurodegeneración producidas por la perfusión de 4-AP (35 mM). La latencia, la frecuencia y la duración se refieren a las descargas en el EEG. La última columna indica la protección contra la neurodegeneración en la región CA1 del hipocampo. No hay correlación que presentaron una reducción en las descargas epileptiformes y la neuroprotección.

5.1.4 Neurodegeneración

En la figura 8 se observa la neurodegeneración inducida por la 4-AP (35 mM) 24 horas después del experimento en ratas tratadas con (1 mg/kg) de retigabina i.p. En la micrografía A se ejemplifica un corte de una rata control profundida con medio Krebs, en el cual se puede apreciar únicamente el daño mecánico producido por el tracto de la cánula de microdiálisis, ya que las zonas aledañas a la cánula presentan células sanas caracterizadas por poseer un citoplasma bien definido, claro, turgente y un soma de entre 20-30 μm .

La micrografía B nos permite observar el efecto de un control de 4-AP (35 mM) en el hipocampo, en el cual se evidencía morfológicamente un patrón de daño caracterizado por la destrucción masiva de las células en la región CA1 sin daño en la zona de CA2 y el giro dentado. Las micrografías C y D representan a las ratas tratadas con retigabina 12 minutos antes del la perfusión con la 4-AP, C ejemplifica la protección observada en 3 animales, mientras que en D se muestran los 15 animales no protegidos. En las micrografías E y F se pone de manifiesto el efecto resultante de las ratas tratadas con Krebs 30 minutos previos a la perfusión con la 4-AP, en donde E comprende a 4 animales con protección y F ejemplifica a 15 ratas con daño. Por último en G y H se muestra el grupo de animales a los que se les administró retigabina 60 minutos antes de la 4-AP. En G se representan 3 animales protegidos y en H se representan 12 con daño. Cabe mencionar que bajo esta condición de administración de la retigabina, a pesar de que es claro que el daño provocado por la 4-AP (35 mM) no es contrarrestado por la aplicación de (1 mg/kg) de retigabina y sólo el 20% de los animales logra protegerse contra la neurodegeneración, esta minoría presenta una muy buena protección a pesar de que no mantuvo una correlación con la disminución de la epilepsia, lo que difiere sustancialmente de los animales dañados, mismos que histológicamente se asemejan en gran medida al control de 4-AP.

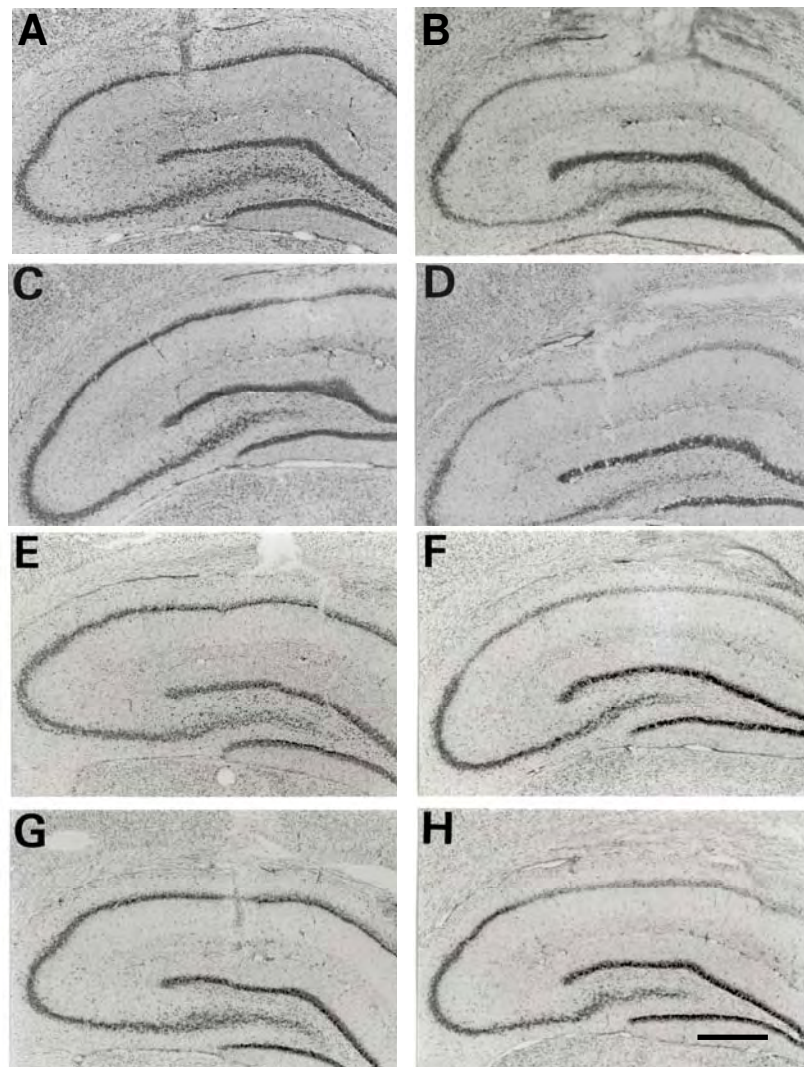


Figura 8. Micrografías representativas de la neurodegeneración inducida en CA 1 por el efecto de la perfusión de 4-AP (35 mM) en el hipocampo y la administración de retigabina (1 mg/kg) a distintos tiempos. **A** muestra el daño mecánico producido por el tracto de la cánula de una rata profundada con Krebs y **B** se muestra el daño provocado por la perfusión de 4-AP en la región de CA1 y CA3 del hipocampo en una rata control. **C** y **D** representan los animales pretratados con retigabina 12 minutos antes de evaluar el efecto con 4-AP. **C** es representativa de la protección observada en tres ratas y **D** ejemplifica a los 15 animales no protegidos. En **E** y **F** se observan las ratas tratadas con retigabina 30 minutos previos a la 4-AP. **E** representa 4 animales con protección y **F** ejemplifica los 15 animales dañados. Las micrografías **G** y **H** conforman los animales pretratados con retigabina 60 minutos antes de la 4-AP. **G** muestra a las 3 ratas protegidas, mientras que **H** muestra a los 12 ratas con daño. Las micrografías corresponden al hipocampo ipsilateral. Barra= 600 μ m.

La figura 9 muestra el número de neuronas sanas en la región de CA1 del hipocampo a las 24 horas después de la perfusión de la 4-AP durante una fracción de microdiálisis y la aplicación de (1 mg/kg) de retigabina a los 12, 30 y 60 minutos de pretratamiento.

En las columnas A se señala el total de las ratas protegidas y en B se marcan las dañadas.

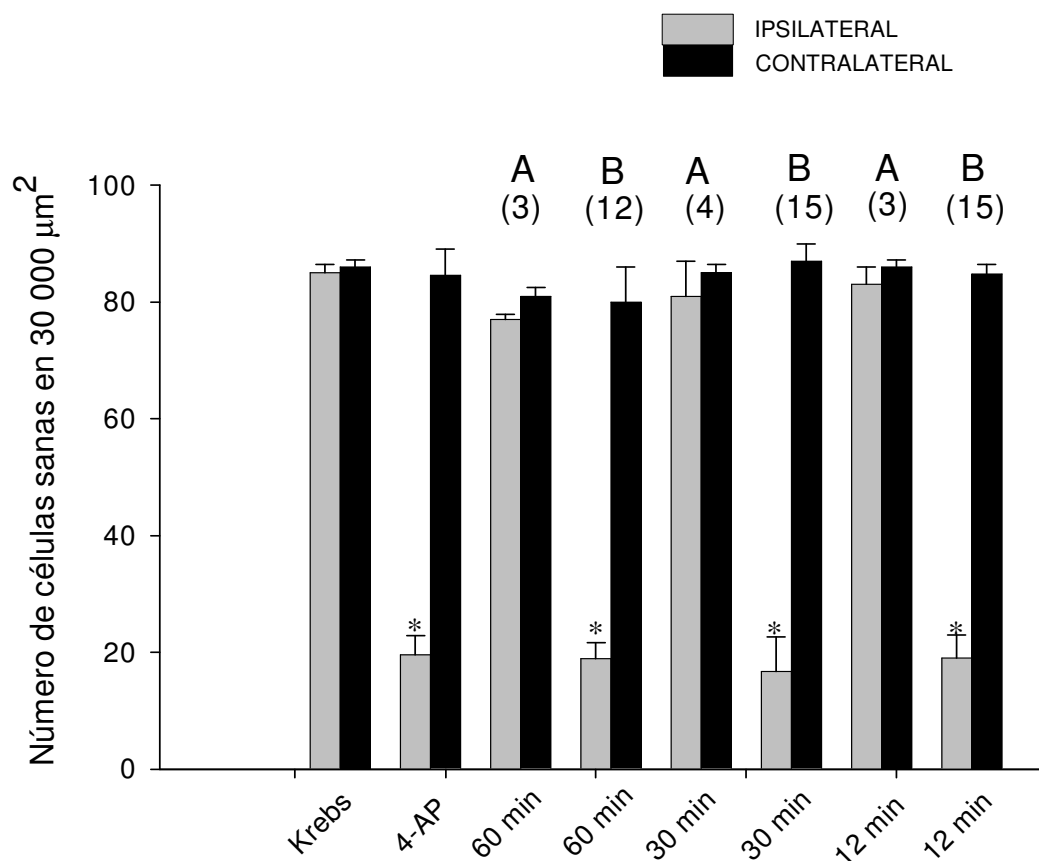


Figura 9. Efecto del pretratamiento con retigabina 1 (mg/kg) a los tiempos señalados sobre el daño neuronal en CA 1 producido por la 4-AP (35 mM) administrada durante una fracción de microdiálisis. Se observó protección en las columnas (A) pero no en las (B), entre paréntesis se señala el número de animales que presentan daño o protección. El conteo celular se realizó en tres ratas por grupo y en tres cortes por rata. * $p < 0.001$ comparado con el valor del control del lado contralateral.

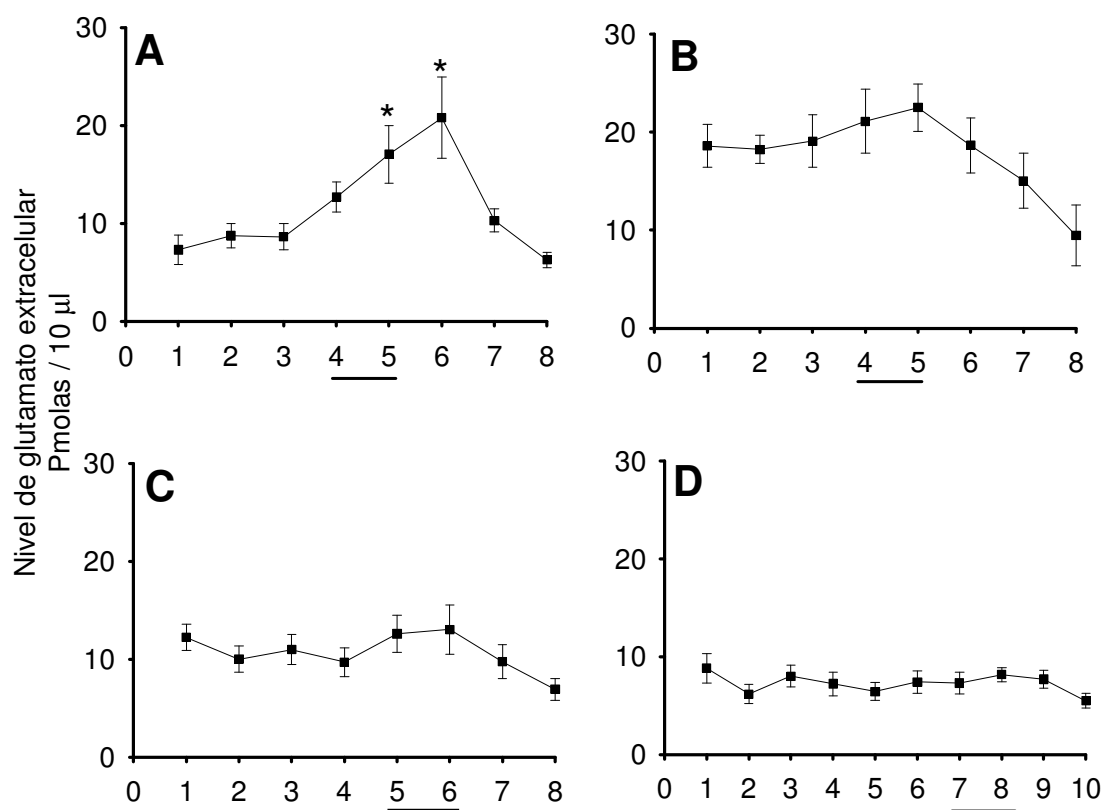
5.1.5 Glutamato extracelular

Como se aprecia en la figura 10, podemos observar el efecto de la 4-AP durante una fracción de microdiálisis sobre el glutamato extracelular en el hipocampo de la rata in vivo. Como se había reportado en experimentos anteriores de nuestro grupo (Peña y Tapia, 1999b, 2000), la 4-AP (35 mM) induce un incremento en los niveles de glutamato extracelular, que difieren de manera significativa de los niveles basales del aminoácido los cuales comprenden las tres primeras fracciones (figura 10-A).

Cabe mencionar que ni el vehículo (HCL a 0.075 M), ni la retigabina a (1 mg/kg) administrados por la vía intraperitoneal modifican los niveles basales de aminoácidos extracelulares que se evaluaron por la técnica de microdiálisis (datos no mostrados).

La administración de retigabina (1 mg/kg) 12.5, 30 y 60 minutos (figura 10, B-D respectivamente), antes de la perfusión de 4-AP (35 mM) durante una fracción de microdiálisis inhibe el incremento en los niveles de glutamato producido por la 4-AP (n=10 por cada grupo).

Es importante resaltar que en todos nuestros experimentos, tanto los grupos control como los que recibieron tratamiento se realizaron en forma paralela.



Fracciones de microdiálisis

Figura 10. Efecto de la perfusión de 4-AP (35 mM) durante una fracción sobre la concentración extracelular de glutamato en el hipocampo de la rata in vivo. **A.** Control de 4-AP sola (n=8). **B, C y D.** Pretratamiento con retigabina (1 mg/kg) i.p. (12.5, 30 y 60 minutos respectivamente, antes de la perfusión con 4-AP (barra horizontal) (n=10) * $p < 0.02$ con respecto al promedio de las fracciones basales.

5.1.6 Administración por microdiálisis de la 4-AP y la retigabina

5.1.7 Actividad EEG

En la figura 11, se muestra el efecto de la co-perfusión de 4-AP (35 mM) y de retigabina (1 mM) durante una fracción de microdiálisis sobre la actividad EEG en el hipocampo. Los trazos representativos ejemplificados en la (figura 13-A) corresponden al control de 4-AP (n=10), en B corresponden al control de retigabina (n=3). En C, podemos ver el trazo representativo del conjunto de ratas que no mostró una disminución en la actividad epileptogénica que genera la 4-AP sola (n=7). En D, observamos cierta reducción de la duración en las descargas de la retigabina contra las crisis (n= 5), efecto que fue más notable en el grupo de animales que se representa en E (n=5). Todos los trazos se ejemplifican a los 30 minutos después de la perfusión de las drogas.

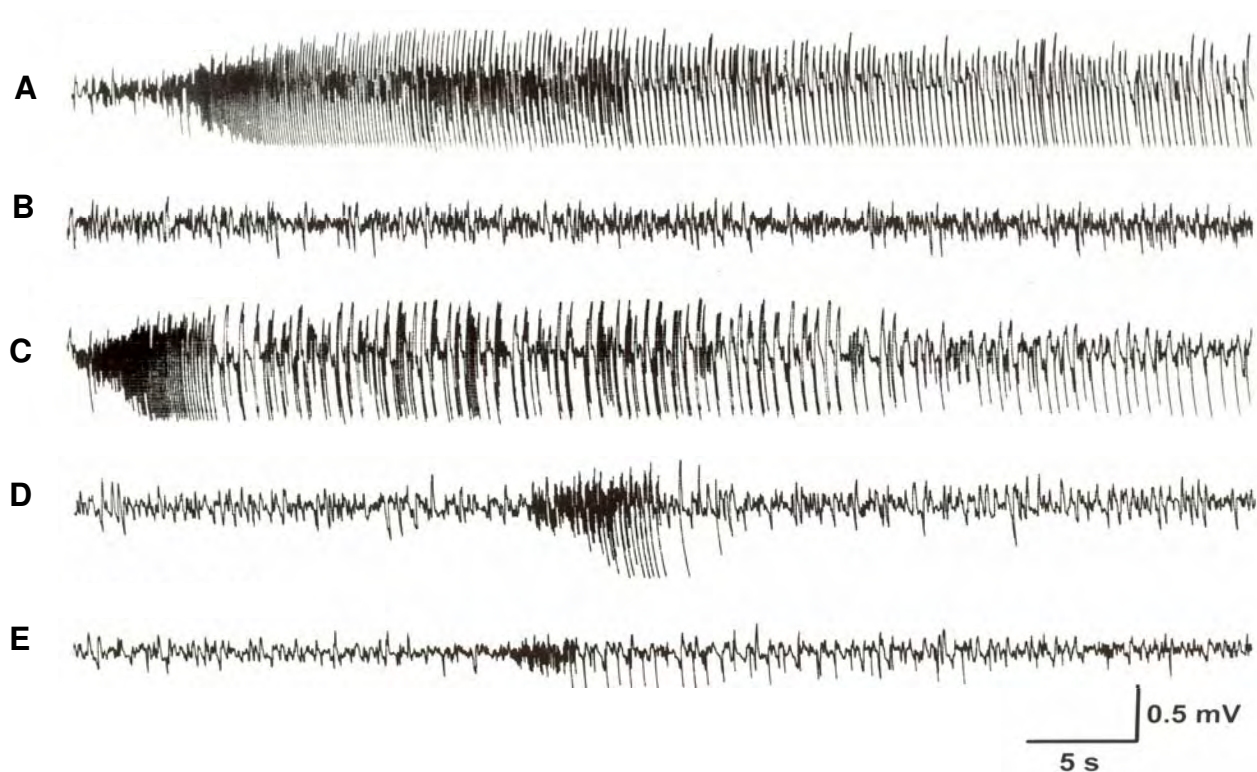


Figura 11. Efecto de la perfusión de 4-AP (35 mM) y de retigabina (1 mM) durante una fracción de microdiálisis sobre la actividad EEG en el hipocampo de la rata anestesiada. **A**, actividad epileptiforme generada por la perfusión de la 4-AP sola (n=10). **B** Control de retigabina (n=3). **C**, **D** y **E**, corresponden a los trazos representativos de ratas que fueron tratadas con ambas drogas. En **C**, se observa un patrón de descargas similares al control de 4-AP (n=7). En **D** (n=5) y **E** (n=5), puede apreciarse la reducción de la duración de las descargas. Todos los trazos corresponden a 30 minutos después de la perfusión simultánea de ambas drogas.

En la tabla 4, se resumen los parámetros evaluados en el EEG. La perfusión conjunta de la retigabina y la 4-AP durante una fracción de microdiálisis no fue capaz de reducir significativamente ni la intensidad ni la duración de las descargas, solo en el 40% de estos animales se reduce la duración de las descargas a expensas de la frecuencia (n=17).

Tratamiento	Latencia de la 1ª descarga (min)	Frecuencia (No. de descargas por hr.)	Duración (s)	Neurodegeneración observada en CA1
Control de 4-AP (35 mM)	21 ± 14.2 n=10	12 ± 1.8 n=10 Todas las ratas tienen descargas	72 ± 13 n=10	Todas las ratas presentan daño n=10
4-AP (35 mM) + Retigabina (1 mM)	18 ± 2.1 n=17	40.1 ± 4.0 n=17	28.5 ± 2.7 n=17	El 69 % de las ratas presenta protección contra el daño

Tabla 4. Efecto de la co-perfusión de 4-AP (35 mM) y retigabina (1 mM) durante una fracción de microdiálisis sobre la actividad epileptiforme y la neurodegeneración provocadas por la 4-AP en el hipocampo de la rata in vivo. No hay correlación que presentaron una reducción en las descargas epileptiformes y la neuroprotección.

Es importante recalcar que este mismo resultado en la actividad epileptogénica se obtuvo al administrar cuatro fracciones de retigabina, dos fracciones de retigabina sola antes de la perfusión de la 4-AP, una fracción posterior con retigabina y 4-AP y una fracción más de retigabina sola (n=12) (Tabla 5).

Tratamiento	Latencia de la 1ª descarga (min)	Frecuencia (No. de descargas por hr.)	Duración (s)	Neurodegeneración observada en CA1
Control de 4-AP (35 mM)	22 ± 11.3 n=10	13 ± 2.0 n=10 Todas las ratas tienen descargas	72 ± 12 n=10	Todas las ratas presentan daño n=10
4-AP (35 mM) + Retigabina (1 mM)	21 ± 1.3 n=12	32.1 ± 3.3 n=12	29.2 ± 2.9 n=12	El 75 % de las ratas presenta protección contra el daño

Tabla 5. Efecto de la perfusión de 4-AP (35 mM) y de retigabina (1 mM) durante cuatro fracciones de microdiálisis sobre la actividad epileptiforme y la neurodegeneración provocadas por la 4-AP en el hipocampo de la rata in vivo. El tratamiento consistió en la perfusión de retigabina sola durante dos fracciones, una fracción posterior de retigabina co-administrada con la de 4-AP (35 mM) y una fracción más de retigabina. No hay correlación que presentaron una reducción en las descargas epileptiformes y la neuroprotección.

Dado que los efectos de 4-AP (35 mM) no fueron revertidos por la retigabina probamos una concentración menor de 4-AP. En la figura 12, se puede apreciar el efecto de la coperfusión de 4-AP (17.5 mM) y retigabina (1 mM) durante una fracción de microdiálisis sobre la actividad EEG. En A observamos los trazos representativos correspondientes a la actividad basal (n=3), mientras que en B se muestran los controles de 4-AP (n=10) y en C, las ratas a las que se les perfundió 4-AP y retigabina paralelamente (n=16). Utilizando esta dosis de 4-AP perfundida junto con la retigabina no se obtiene protección contra las crisis epileptiformes en ninguno de los parámetros evaluados en el total de nuestros animales tratados. En la tabla 6, podemos encontrar la síntesis de las condiciones probadas.

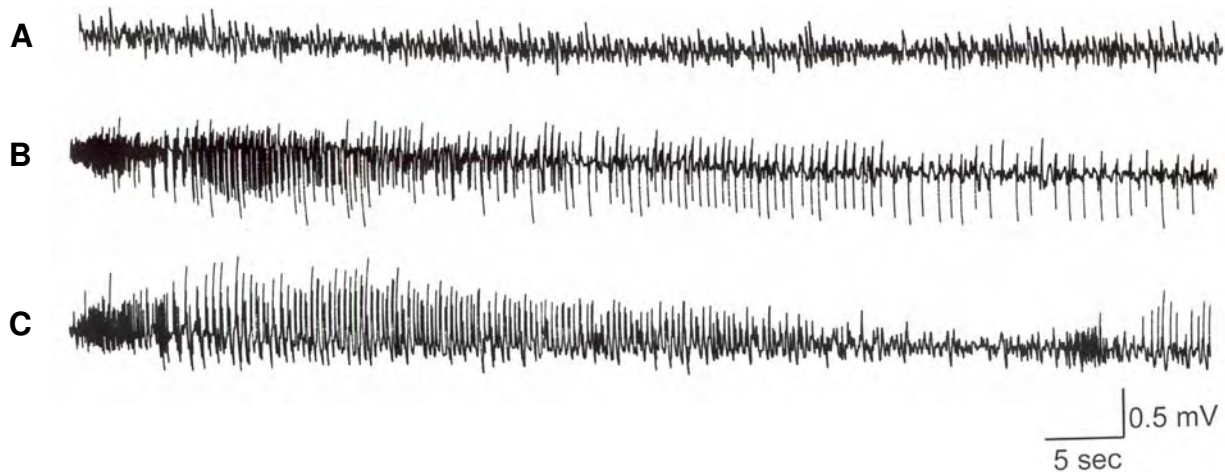


Figura 12. Efecto de la copperfusión de 4-AP (17.5 mM) y retigabina (1 mM) durante una fracción de microdiálisis sobre la actividad EEG en el hipocampo de la rata anestesiada. **A**, muestra los trazos de la actividad basal generada por la perfusión de medio krebs (n=3). En **B**, se aprecia la actividad de los controles de 4-AP (n=10). En **C**, se representan los animales tratados con ambas drogas durante una fracción de microdiálisis.

Tratamiento	Latencia de la 1ª descarga (min)	Frecuencia (No. de descargas por hr.)	Duración (s)	Neurodegeneración observada en CA1
Control de 4-AP (17.5 mM)	11 ± 1.1 n=10	44 ± 3.9 n=10 Todas las ratas tienen descargas	37 ± 4.1 n=10	Todas las ratas presentan daño n=10
4-AP (17.5 mM) + Retigabina (1 mM)	11 ± 0.69 n=16	43.1 ± 4.1 n=16 Todas las ratas tienen descargas	37 ± 3.2 n=16	El 86 % de las ratas presenta protección contra el daño n=12

Tabla 6. Efecto de la copperfusión de 4-AP (17.5 mM) y retigabina (1 mM) durante una fracción de microdiálisis sobre la actividad epileptiforme y la neurodegeneración provocadas por la 4-AP en el hipocampo de la rata in vivo.

5.1.8 Neurodegeneración

Como ya ha sido descrito previamente (Peña y Tapia, 1999b; Ayala y Tapia, 2003) la perfusión de la 4-AP (17.5 y 35 mM) produce una notable neurodegeneración en las regiones de CA1 y CA3 en el hipocampo, mientras que la perfusión de la retigabina sola es inocua en el tejido hipocampal.

El análisis histológico de las ratas tratadas con 4-AP (35 mM) conjuntamente con la retigabina por microdiálisis después de 24 horas del experimento (figura 13), muestra que la retigabina protege contra el daño neuronal cuando es co-administrada con la 4-AP durante una sola fracción o durante cuatro fracciones, es decir, dos fracciones de retigabina sola, una con 4-AP y una más con retigabina sola. Encontramos que con una fracción (12.5 min) se lograron proteger 11 animales de 16 y con cuatro fracciones (50 min) se protegieron 9 ratas de 12.

Con la concentración más baja de 4-AP (17.5 mM) utilizada en este estudio, obtuvimos una clara neuroprotección contra la 4-AP por la retigabina (figura 14). Bajo esta condición, la retigabina ofrece una protección del 86% de los animales contra la 4-AP (n=14). El análisis cuantitativo en la región CA1 del hipocampo se muestra en la (figura 15) con 4-AP (17.5 mM) se observa la mejor protección (figura 15-A). El tratamiento con 4-AP (35 mM) se aprecia en la (figura 15-B).

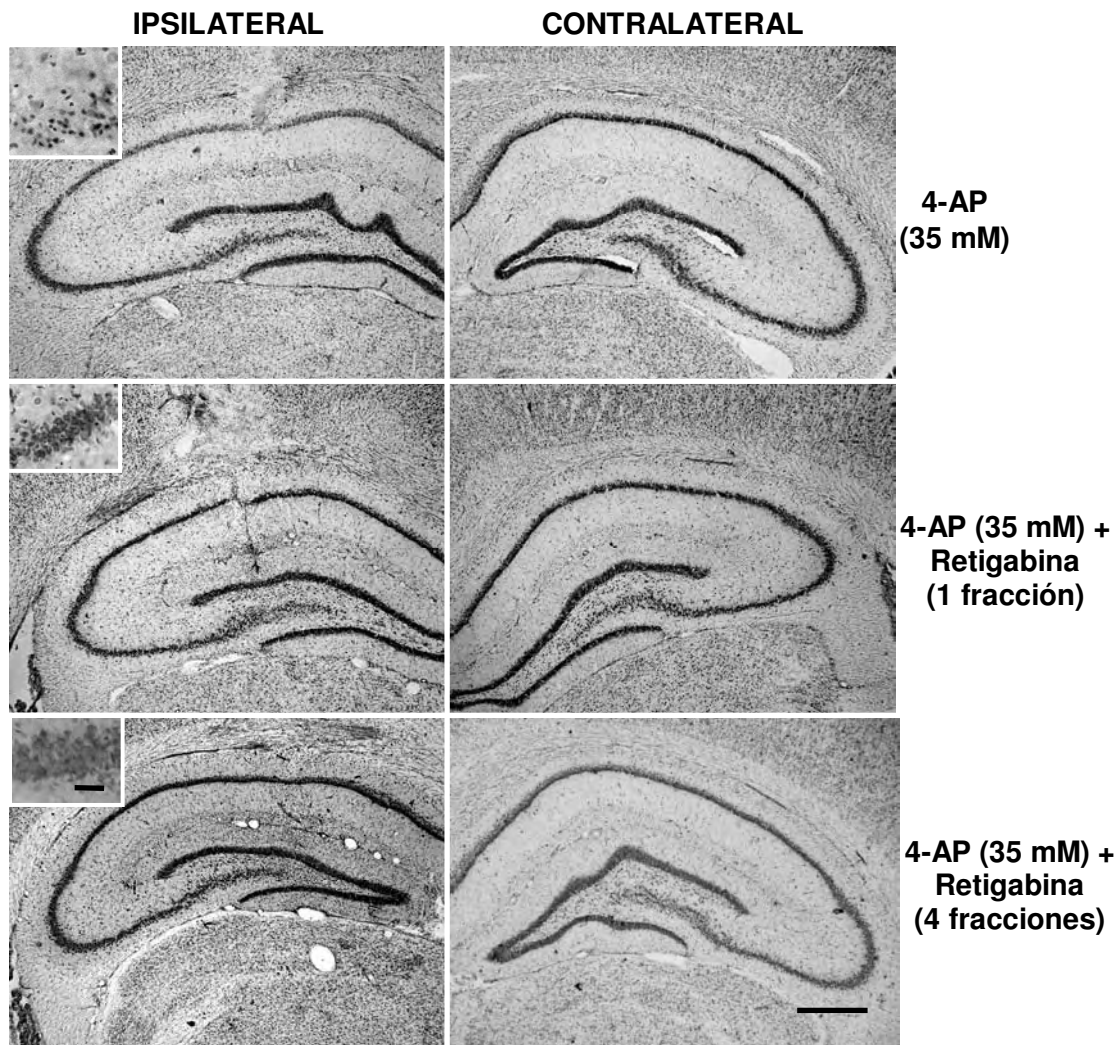


Figura 13. Micrografías representativas de la neurodegeneración inducida por 4-AP (35 mM) después de 24 horas y la protección de retigabina (1mM) durante (12.5 min) o durante (50 min) de su perfusión por microdiálisis. Como puede apreciarse, bajo ambas condiciones la retigabina protege contra el daño que claramente produce la 4-AP. En los cortes que ejemplifican las ratas tratadas con la retigabina durante una fracción logran protegerse 11 de 16 ratas, mientras que la administración de 4 fracciones, es capaz de proteger a 9 de 12 animales. Cada par de micrografías (ipsilateral y contralateral) corresponden a la misma rata. Barras= 600 μm y 60 μm en los aumentos (cercano al tracto de la cánula).

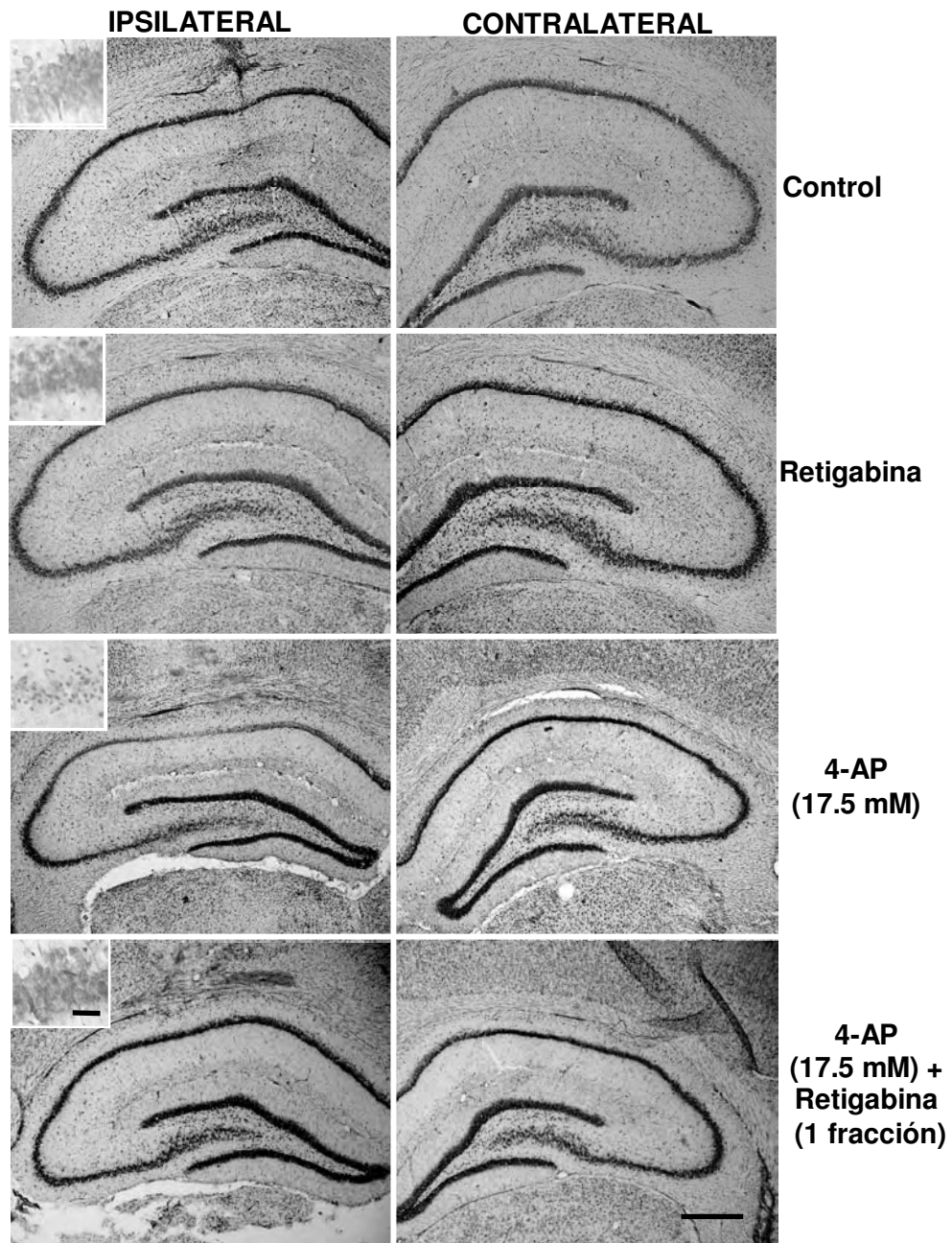


Figura 14. Micrografías representativas de la neurodegeneración producida en el hipocampo por la administración de 4-AP (17.5 mM) 24 horas posteriores al experimento. Cada par de micrografías (ipsilateral y contralateral) corresponden a la misma rata. En el primer par de micrografías observamos los controles de Krebs (n=3). En el segundo panel podemos apreciar que la administración de retigabina por si sola resulta inocua (n=3). En los cortes representativos del control de 4-AP (n=10) podemos apreciar el daño generado en CA1 en contraste, con la protección que muestran los cortes que ejemplifican a los animales tratados con retigabina (1 mM) durante una fracción de microdiálisis conjuntamente con la perfusión de 4-AP (n=12). Barras= 600 μ m y 60 μ m en los aumentos (cercano al tracto de la cánula).

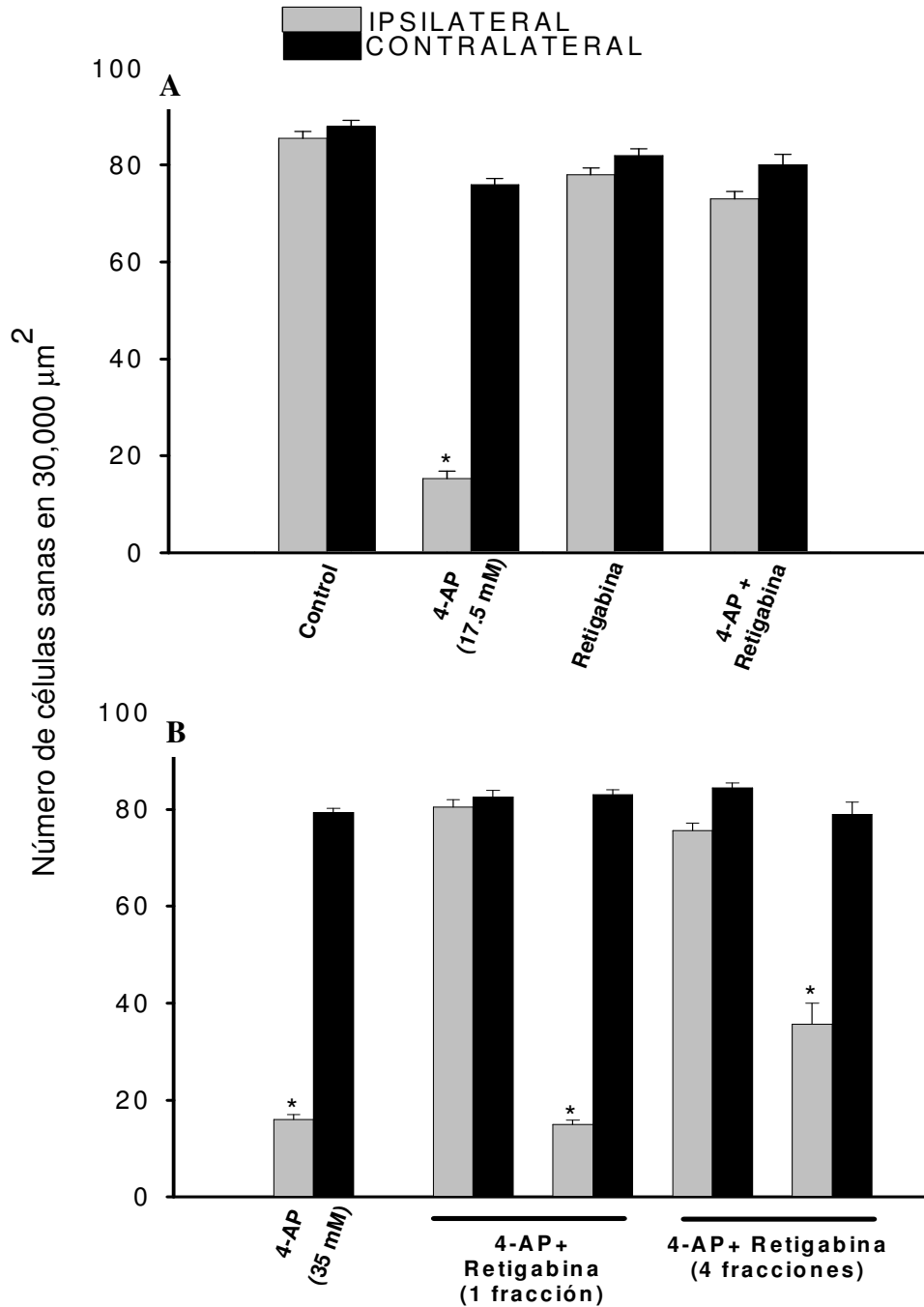


Figura 15. Número de células sanas en la capa piramidal de CA 1 del hipocampo 24 horas después de la perfusión de 4-AP (17.5 mM), (35 mM) y retigabina (1 mM) en la rata in vivo. La pérdida neuronal causada por la 4-AP con ambas concentraciones fue similar. La retigabina por si sola no produce ningún efecto y previene totalmente el daño causado por 4-AP (17.5 mM) en 12 de 14 ratas (cuarto par de columnas) (A). Con la concentración de (35 mM) de 4-AP, la perfusión de retigabina durante una sola fracción protege a 11 de 16 ratas (segundo par de columnas), mientras que la mejor protección con retigabina fue observada cuando se perfundió durante cuatro fracciones (B). El conteo celular se realizó en tres ratas por grupo y en tres cortes por rata. * $p < 0.001$ comparado con el valor del control del lado contralateral.

5.1.9 Glutamato extracelular

Como es posible notar en la figura 16, se observa al grupo de ratas control tratadas con retigabina (1 mM) administrada durante una fracción de microdiálisis en el hipocampo de la rata (n=3), en las cuales no se observó el aumento del glutamato, que mantiene sus niveles basales.

En contraste, observamos que la perfusión de 4-AP a una concentración de (35 mM y 17.5 mM) durante una fracción de microdiálisis muestran una elevación de glutamato extracelular, de manera significativa mientras que con la dosis más baja, el cambio fue significativo (figura 16- A) (n=8 por grupo), (Ayala y Tapia, 2003).

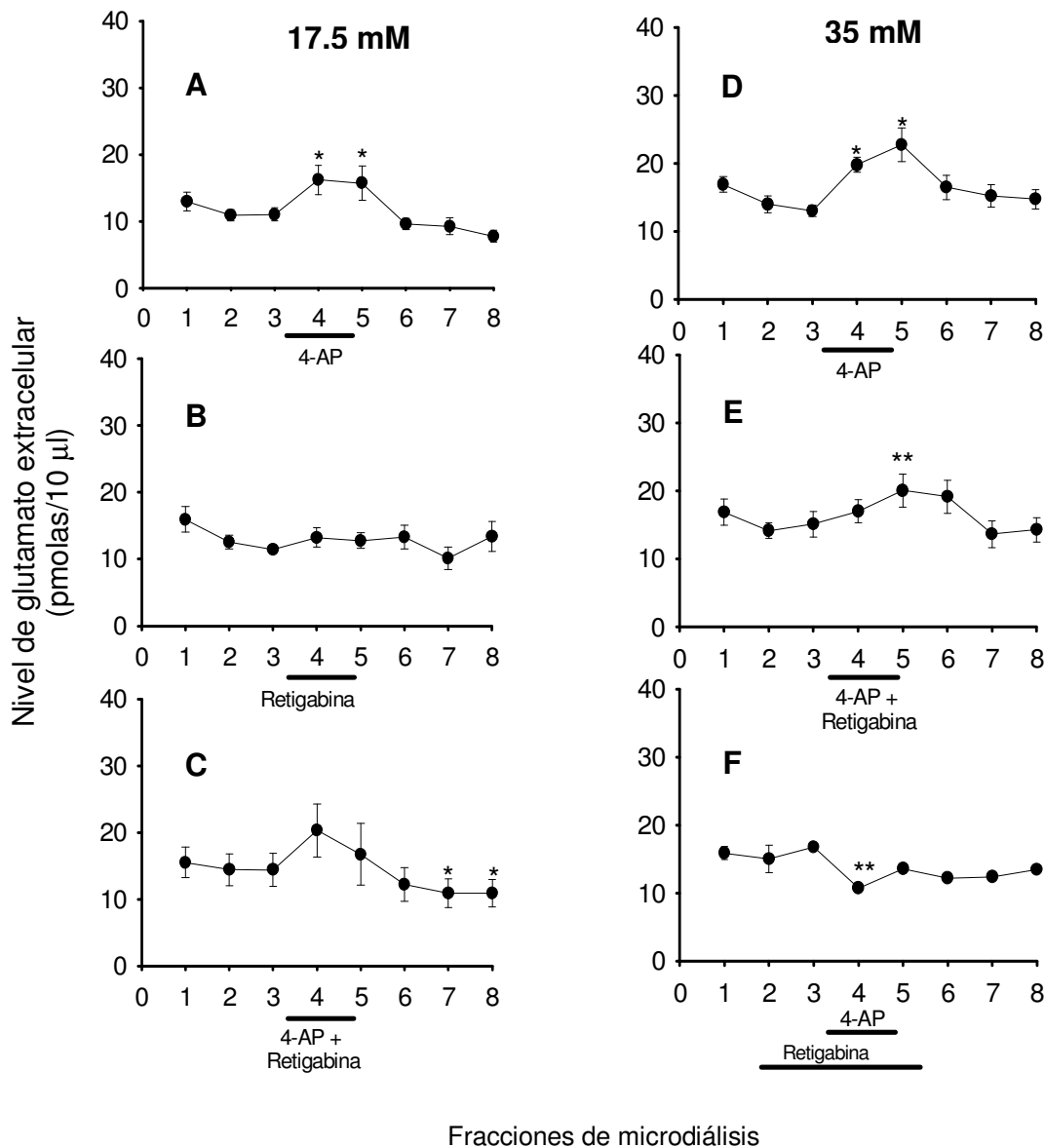


Figura 16. Efecto de la co-perfusión de una fracción de 4-AP (17.5 mM) o (35 mM) y una fracción o cuatro fracciones de retigabina (1 mM) sobre la concentración extracelular de glutamato en el hipocampo de la rata in vivo. En **A**, se observa la elevación en el nivel de glutamato por la 4-AP (17.5 mM) con un valor de $*p < 0.02$ en comparación con el promedio de las tres primeras fracciones basales. En **B**, se observa que la retigabina sola perfundida durante una fracción (12.5 min) no tiene efecto sobre la liberación. En **C**, se muestra que la perfusión simultánea de ambas drogas durante una fracción produce un ligero incremento del glutamato que se encuentra en los límites de significancia ($p = 0.052$). En **D**, podemos ver un efecto más claro de la 4-AP (35 mM) sobre la concentración extracelular del glutamato. En **E**, se observa la elevación de glutamato inducido por la co-perfusión de 4-AP y retigabina durante una fracción. En contraste **F**, muestra la perfusión de una fracción de 4-AP y 4 fracciones (50 min) de retigabina lo que notablemente produce una reducción sobre concentración del glutamato ($* p < 0.005$ y $** p < 0.05$) a diferencia de el promedio de las tres primeras fracciones basales. Las barras horizontales indican el tiempo de perfusión de las drogas. Las gráficas se hicieron con el promedio de 8 ratas por grupo excepto en B ($n=3$).

5.2 La 4-AP y la minociclina

5.2.1 Neurodegeneración

En la figura 17, se aprecia el efecto neurodegenerativo inducido por la perfusión de una fracción de 4-AP (35 mM) en el hipocampo, 24 horas después del experimento (n=8). En las micrografías representativas de un total de 21 animales puede observarse claramente que el tratamiento con minociclina (100 mg/kg) (Yrjänheikki y col., 1998; Sanchez y col., 2001) aplicada i.p. tanto de manera aguda (n=11) como crónica (n=10) (G-H) no contrarrestó la neurodegeneración que provoca la 4-AP.

Como se resume en la tabla 7, la minociclina no modificó ningún parámetro evaluado en la actividad EEG provocada por la 4-AP (registros no mostrados).

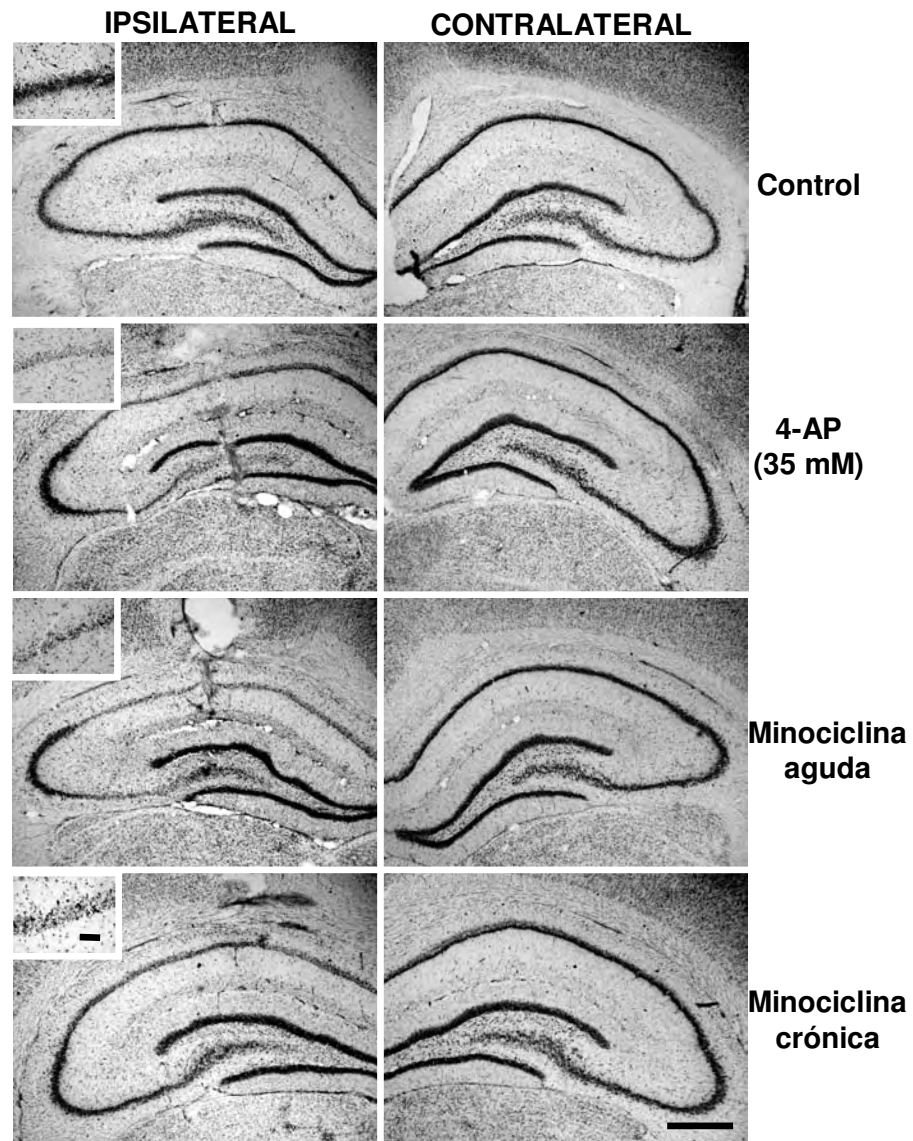


Figura 17. Micrografías representativas de la neurodegeneración inducida por 4-AP (35 mM) y la administración sistémica de minociclina (100 mg/kg) tanto de manera aguda como crónica después de 24 horas en el hipocampo de la rata in vivo. El efecto de la 4-AP no fue modificado por el tratamiento agudo con minociclina (n= 11) ni con el crónico (n=10). Cada par de micrografías (ipsilateral y contralateral) corresponden a la misma rata. Barras= 600 μ m y 60 μ m en los aumentos (cercano al tracto de la cánula).

Tratamiento	Latencia de la 1ª descarga (min)	Frecuencia (No. de descargas por hr.)	Duración (s)	Neurodegeneración observada en CA1
Control de 4-AP (35 mM)	18 ± 4.1 n=10	15 ± 1.2 n=10 Todas las ratas tienen descargas	74 ± 6.3 n=10	Todas las ratas presentan daño n=10
4-AP (35 mM) + Minociclina (100 mg/kg) crónica/aguda	15 ± 1.4 n=21	36 ± 4.2 n=21 Todas las ratas tienen descargas	26 ± 1.9 n=21	Todas las ratas presentan daño n=21

Tabla 7. Efecto de la administración crónica y aguda de minociclina (100 mg/kg) sobre la actividad epileptiforme y la neurodegeneración producidas por la perfusión de 4-AP (35 mM) durante una fracción de mictodiálisis en el hipocampo de la rata in vivo.

5.2.2 Glutamato extracelular

En la figura 18 se muestran las ratas tratadas con minociclina bajo el esquema agudo (figura 18-B) (n=8) y bajo el esquema crónico (figura 18-C) (n=8) y se puede apreciar que en ambas condiciones no se presentan cambios en el nivel de glutamato extracelular, de hecho se asemejan a los controles de 4-AP (35 mM) (figura 18-A) (n=8) cuyo efecto sobre la liberación de glutamato ya ha quedado por sentado en trabajos previos de nuestro grupo y es claramente, reproducible.

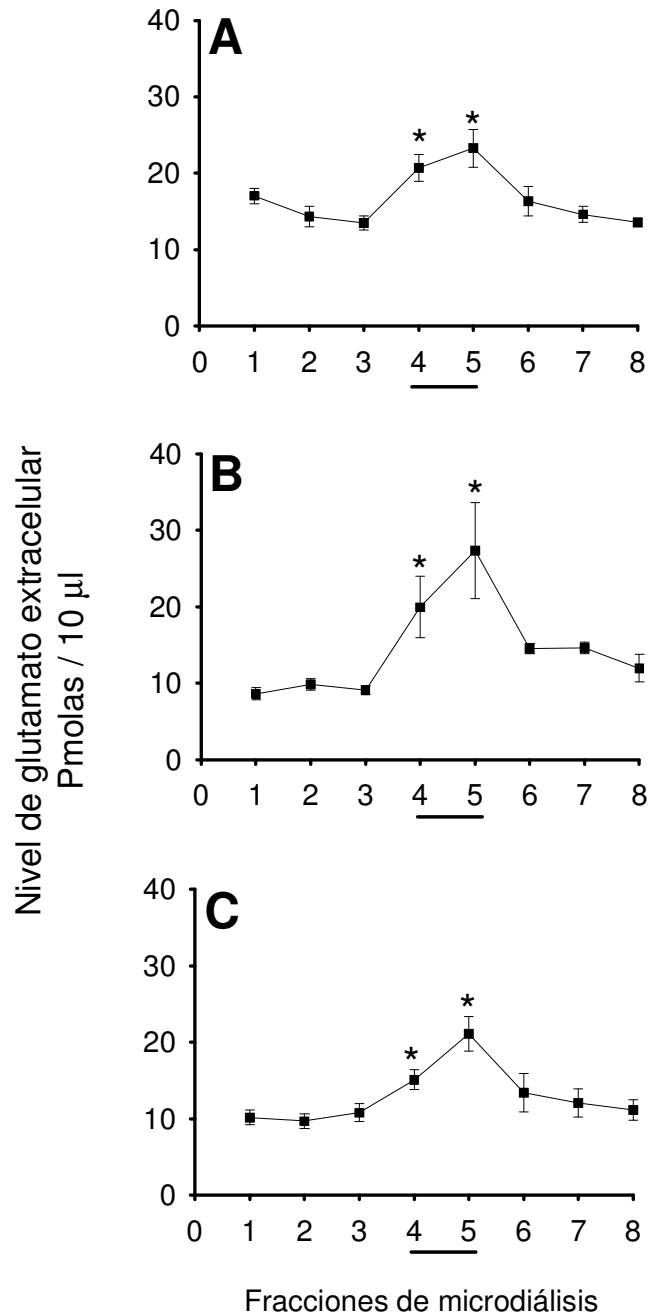


Figura 18. Efecto de la concentración extracelular de glutamato inducida por la perfusión de una fracción de 4-AP (35 mM) (barra horizontal) y la administración de minociclina (100 mg/kg) i.p. aplicada bajo un esquema agudo o crónico. En **A**, se observa el incremento en el nivel de glutamato por la 4-AP, mismo que no es modificado por la aplicación de minociclina aguda **B**, ni crónica **C**. (n=8 por grupo). * $p < 0.001$ en comparación con el promedio de las fracciones basales.

6. DISCUSIÓN

En virtud de la enorme importancia que tiene el entender más a fondo la neurobiología del proceso epiléptico, así como los factores que puedan predecir o dilucidar el riesgo o progresión del mismo, es necesario explorar nuevas oportunidades para el desarrollo de tratamientos antiepilépticos y neuroprotectivos al disectar los mecanismos de acción involucrados. Es por esta razón, que en este trabajo se planteó la utilización de fármacos recientemente estudiados como la retigabina y la minociclina en nuestro modelo de epilepsia in vivo generado por la 4-AP.

6.1 Retigabina

Uno de los hallazgos más importantes del presente estudio es la prevención que ofrece la retigabina contra el daño neuronal inducido por la 4-AP en el hipocampo, misma que se lleva a cabo simultáneamente a la inhibición del efecto de estimulación de la 4-AP sobre la liberación de glutamato, determinada por la técnica de microdiálisis.

A pesar de que el daño producido por las dos dosis de 4-AP utilizadas (17.5 mM) y (35 mM) fue similar, la retigabina resultó ser más eficiente contra la dosis menor de 4-AP perfundida durante 12.5 min (una fracción). En estas condiciones la retigabina protegió a un 86% de los animales tratados, mientras que para obtener una protección similar contra 35 mM de 4-AP se necesitó de la perfusión de cincuenta minutos (cuatro fracciones) con retigabina.

Este efecto protector podría ser atribuido a la inhibición de la liberación de glutamato inducido por la 4-AP, dado que bajo todas las condiciones experimentales probadas, es decir, por la vía sistémica y por microdiálisis, la retigabina produce ambos efectos.

Esta interpretación se apoya en las observaciones previas hechas en nuestro laboratorio (Peña y Tapia, 1999b) en las cuales se demostró que la dosis de 17.5 mM de 4-AP es relativamente baja y produce solo un ligero efecto estimulador sobre la liberación de glutamato mientras que, con la dosis de 35 mM se produce un incremento más evidente en la concentración extracelular del aminoácido y éste incremento no se ve modificado por los antagonistas del receptor a glutamato probados en el estudio de (Peña y Tapia, 2000).

En apoyo a nuestro planteamiento sobre la posibilidad de que la inhibición de la liberación de glutamato sea el mecanismo protector que ejerza la retigabina contra la 4-AP observado en el presente trabajo in vivo, encontramos que los hallazgos recientes hechos en sinaptosomas de hipocampo (Martire y col., 2004) correlacionan con nuestras observaciones. Bajo este paradigma experimental, la retigabina de manera dosis respuesta, inhibe notablemente la despolarización evocada por alto K^+ que produce un aumento en la liberación de norepinefrina, GABA y D-aspartato, este último utilizado indirectamente para conocer el nivel de glutamato, ya que su metabolismo es más resistente.

Además, la retigabina fue capaz de bloquear la liberación de norepinefrina marcada radioactivamente provocada por (100 μ M) de 4-AP, sin embargo los niveles de D-aspartato bajo esta condición no fueron estudiados. En este trabajo también se demostró que anticuerpos contra la subunidad KCNQ2 del canal de K^+ que activa corrientes M, impiden que la retigabina induzca la inhibición de la liberación de [3 H]norepinefrina provocada por la despolarización de K^+ , lo cual sugiere que estos canales participan en la regulación de la liberación de neurotransmisores en las terminales nerviosas de hipocampo.

De hecho, estas subunidades KCNQ2 codifican para las corrientes M, que son un tipo de corrientes de K⁺ dependientes de voltaje específicamente neuronales relacionadas con el control de la excitabilidad neuronal, se expresan postsinápticamente tanto en el soma como en las dendritas hipocámpales y por estudios de inmunoreactividad han sido localizadas también en la presinápsis, en los axones, en las terminales nerviosas de las fibras musgosas y en el stratum lucidum de la región CA3 del hipocampo en el cerebro tanto del ratón como en el del humano (Cooper y col., 2000, 2001).

Más aún, la expresión de estas subunidades KCNQ2 en terminales axónicas de las capas de CA1 y CA3 en el hipocampo ha sido comprobada por el empleo de microscopía electrónica en cerebro de monos macacos (Fieles y col., 2002).

Otro mecanismo potencial que podría participar en las propiedades anticonvulsivantes de la retigabina, y que posiblemente pudiera estar involucrado también en la acción neuroprotectora contra la 4-AP observado en este trabajo de tesis, es el efecto de la retigabina sobre los aminoácidos neurotransmisores. Tal es el caso del trabajo de Kapetanovic y sus colaboradores (1995) que muestran que en rebanadas de hipocampo, la retigabina previene el incremento de la síntesis de novo de glutamato y GABA inducidos por la 4-AP, y por sí misma es capaz de estimular la síntesis de GABA. Más aún, se conocen datos que demuestran que en cultivo de neuronas corticales, la retigabina potencia las corrientes inducidas por GABA. Sin embargo, aunque no podemos dejar de lado que el mecanismo involucrado en la neuroprotección por la retigabina descrito por el grupo de Kapetanovic, represente un hallazgo importante que no debe descartarse, nosotros en nuestro modelo, no encontramos ningún cambio en la concentración extracelular de GABA ni de otros aminoácidos cuantificados por cromatografía.

En este mismo sentido, otros datos relacionados, indican en el cerebro de ratón, que una sola dosis de retigabina (1 mg/kg) administrada sistémicamente puede reducir la

concentración de glutamato y glutamina y dosis altas de ésta, disminuyen la actividad de la enzima GABA transaminasa, hecho que sugiere que la retigabina bloquea el metabolismo del GABA más que potenciar su síntesis, sin embargo, el tratamiento agudo de retigabina no tuvo efecto sobre la actividad de la enzima (Sills y col., 2000).

Pocos son los estudios que mencionan el efecto neuroprotector de la retigabina en comparación con el amplio número de estudios que acreditan su acción anticonvulsivante, tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*, descritos con anterioridad en los antecedentes.

Ebert y sus colaboradores (2002), encuentran que la retigabina administrada por vía sistémica notablemente protege contra la neurodegeneración inducida por kainato que ocurre en la corteza piriforme de rata después de la generación de un status epilepticus (SE), sin embargo cabe notar que resultó inefectiva en el hipocampo.

A la fecha el único trabajo hasta ahora conocido que ofrece neuroprotección involucra a las células PC12. En él, se mostró que la retigabina protege a estas células contra la necrosis inducida por glutamato (Seyfried y col., 2000), a pesar de ello y en contraposición a los resultados presentados en el mismo, el efecto del glutamato no está relacionado con la excitotoxicidad, debido a las observaciones de Ebert y su grupo anteriormente mencionadas, que indicaron que el MK-801, antagonista del receptor a glutamato del tipo NMDA, no protege contra el daño en el hipocampo y por sí mismo resultó inefectivo. En esta misma dirección, observaciones no publicadas de Rundfeldt y colegas, describen que la retigabina no suprimió las corrientes mediadas por NMDA ni por AMPA (Rundfeldt y col., 1995).

En contraste con el efecto neuroprotector de la retigabina contra el daño producido por la 4-AP, en la presente tesis encontramos que la administración de la retigabina, resultó insuficiente para proteger contra las crisis epileptiformes generadas por la perfusión de

una o más fracciones de 4-AP, pese a que trabajos previos de nuestro grupo han mostrado que cuando la liberación de glutamato estimulada por la 4-AP es disminuida por el bloqueo de los potenciales de acción con tetrodotoxina, la cual bloquea los canales de sodio sensibles a voltaje, se logran prevenir notablemente las descargas epileptiformes. Este efecto diferencial fue observado también, al coaplicar la 4-AP con la ω -conotoxina, droga conocida como abridor de canales de calcio tipo-N presinápticos (Peña y Tapia, 2000).

Con base en lo anterior podemos concluir que la estimulación de la liberación de glutamato juega un papel relevante en la generación de las crisis inducidas por la 4-AP, pero no es el único factor que interviene en el desarrollo de estas descargas (Peña y Tapia, 1999b). Esta conclusión se refuerza por el hecho de que drogas como el riluzol, la diazoxida e incluso antagonistas del receptor GABA_A, picrotoxina y bicuculina, las cuales bloquearon parcialmente la liberación de glutamato inducida por la 4-AP, no fueron capaces de prevenir contra las crisis epileptiformes (Peña y Tapia, 2000).

Otro punto a considerar lo conforman nuestras observaciones después de la administración sistémica de la retigabina contra la 4-AP, que muestran la carencia de un efecto protector contra las descargas epileptiformes a una dosis relativamente baja de retigabina (1 mg/kg), hecho que podría deberse a un efecto tóxico de la anestesia por halothano, ya que dosis más altas de retigabina (2.5, 5, 8 mg/kg) en estas condiciones produjeron la muerte en el 100% de animales tratados. Estos resultados contrastan con los datos citados en la literatura, que indican un efecto antiepiléptico de la retigabina a dosis de (2.5, 4, 5, 7.5, 10, 20, 30 mg/kg) en varios modelos de epilepsia (Tober y col., 1996; Rostock y col., 1996).

En suma a lo antes mencionado, en nuestros experimentos conductuales en los cuales se administraron las drogas de manera intraperitoneal, la retigabina también resultó incapaz de prevenir o atenuar las convulsiones generadas por (5 mg/kg) de 4-AP

(Fragoso-Veloz y col., 1990). Más aún, las presentes observaciones indican que podría presentarse un efecto tóxico de la retigabina también en la rata despierta, ya que dosis de retigabina de (5 mg/kg) parecen incluso potenciar el efecto convulsivante de la 4-AP. Este hallazgo cobra fuerza si tomamos en cuenta que la retigabina en la actualidad es un fármaco que se encuentra en la fase II de prueba en la clínica y que no existe hasta ahora ningún estudio en modelos animales de epilepsia que señale su toxicidad. Pese a esto, nuestros experimentos demostraron que después de la aplicación de (2.5-8 mg/kg) de retigabina se presenta una clara depresión en el registro encefalográfico posterior a unos minutos de su administración. Este acontecimiento podría suceder como consecuencia de un efecto tóxico de la droga por sí sola, que finalmente se manifieste por un paro respiratorio en los animales.

Es posible que la ausencia de protección por la retigabina versus la epilepsia producida por la 4-AP pueda deberse a su farmacocinética, ya que resultados preliminares, indican que la retigabina administrada sistémicamente en la rata, posee una vida media y una concentración más alta en el cerebro que en el plasma (Rostock y col., 1996).

Es importante recalcar que en la mayoría de los estudios, la retigabina es más efectiva como anticonvulsivante cuando la epilepsia es generada por un mecanismo eléctrico en comparación con la epilepsia inducida por agentes químicos (Rostock y col., 1996).

Además y comparativamente con la curva de concentración dosis-respuesta de la retigabina, se ha visto que la apertura del canal de K^+ por la retigabina es aproximadamente 100 veces más sensible de lo que se necesita para potenciar las corrientes inducidas por GABA (Rudfeldt y Netzer, 2000b).

Por ello podríamos concluir que el efecto potenciador de GABA provocado por la retigabina, podría participar con menor importancia en la neurprotección en comparación con la actividad de abridor de canal de K^+ . Esta conclusión puede ser apoyada por trabajos previos (Peña y Tapia, 2000), los cuales mostraron que de manera

parecida a la retigabina, la diaxoxida, abridor de canales de K^+ sensibles a ATP, inhibe en un 55% el incremento extracelular de glutamato y logra proteger parcialmente la muerte neuronal, pero no las descargas epileptiformes, inducidas por la 4-AP administrada intrahipocampalmente.

En conclusión nuestros resultados demostraron que la retigabina protege contra el daño neuronal, pero no contra la epilepsia generada como consecuencia de un exceso en la liberación de glutamato endógeno de las terminales nerviosas en el hipocampo producido por la 4-AP in vivo.

Dado que el efecto neuroprotectivo que encontramos correlaciona con la acción inhibitoria de la estimulación de la liberación de glutamato por la 4-AP, y tomando en cuenta que la retigabina es un compuesto con la capacidad de producir la apertura de canales de K^+ sensibles a voltaje del tipo KCNQ2/3, que hiperpolarizan las terminales nerviosas y de esta manera puede regular la liberación de neurotransmisores, nosotros sugerimos esto como un posible mecanismo de neuroprotección.

6.2 Minociclina

Dentro de una segunda fase de este trabajo, se abordó el empleo de la minociclina, un fármaco con propiedades antibióticas y anti-inflamatorias, como un probable agente neuroprotector del daño provocado por la 4-AP, en virtud de la relevancia que demanda preservar o minimizar en la medida de lo posible, la pérdida neuronal sufrida durante el proceso epiléptico.

Está bien establecido que la neurodegeneración causada por la inflamación, involucra la activación de células del sistema inmune en el cerebro, lo que en consecuencia produce la activación de varios factores pro-inflamatorios.

Algunos autores han mostrado que una lesión aguda en el cerebro como un evento de isquemia o de SE se encuentran ligados a un mecanismo inflamatorio el cual podría contribuir a desencadenar distintos episodios neuropatológicos (Ekdahl y col., 2001, 2003). Este mismo grupo (2001), observó que después de un severo SE hay una pérdida neuronal del 80% en el giro dentado lo que se relaciona con la aparición de una respuesta inflamatoria.

En este sentido se acepta de manera general, que la microglía, conformada por células comprometidas en la respuesta del sistema inmune ante un agente externo infecciosos o bien un daño al organismo (Liu y Hong, 2003) libera como mecanismo de defensa una gran variedad de factores tóxicos que pueden exacerbar la degeneración de las neuronas y contribuir en el proceso neurodegenerativo. Sin embargo, pese a estos datos, se ha visto que la inflamación por sí misma es insuficiente para producir neurodegeneración aguda in vivo (Morimoto y col., 2002).

Con base en lo anteriormente expuesto surge el interés de buscar el empleo de drogas con potencial anti-inflamatorio como la minociclina que pudieran disminuir o bien prevenir el daño neuronal. Bajo este esquema no es difícil pensar que en nuestro modelo de neurodegeneración producido por la 4-AP, participe la respuesta inflamatoria, ya que nuestros estudios previos (Ayala y Tapia, 2003) ponen de manifiesto la generación de una evidente gliosis después de cinco días de perfundida la 4-AP en el hipocampo, aunque es posible observar muerte celular a partir de las seis horas de tratamiento.

A pesar de este planteamiento, los resultados del presente trabajo sugieren que la inflamación no participa de manera importante en la generación de la muerte excitotóxica, dado que el tratamiento con la minociclina tanto de manera crónica como aguda no logró proteger o revertir el daño en las células del hipocampo.

En apoyo a las limitaciones de la minociclina, más recientemente el grupo de Bantubungi (2005), encontró en un modelo fenotípico de la enfermedad Huntington, producto de la intoxicación con 3-NP en ratas, que este fármaco no logró proteger contra las lesiones desarrolladas en el estriado que involucran a la calpaina, lo cual sugiere que en el caso del Huntington, la minociclina contrarresta bien la neurodegeneración dependiente de caspasas (Chen y col., 2000) y en cierta medida la inflamación pero no así, cuando la muerte neuronal comprende la actividad de calpainas.

Este resultado cobra fuerza si tomamos en cuenta que la calpaina, proteasa que esta presente en las neuronas y que es activada por concentraciones altas de calcio similares a las que se encuentran durante el daño neuronal (Siman y col., 1989) pudiera potenciar otros mecanismos en los cuales se produce la acumulación de Ca^{2+} intracelular y se logran rebasar los sistemas de amortiguamiento celular (Choi, 1988) dando cabida a una serie de acontecimientos que condujeran finalmente, a la degradación de varios componentes fundamentales para la sobrevivencia neuronal, y pudiera perfilarse así, como uno de los posibles blancos que determinan el incremento excitotóxico.

Estos datos sugieren que durante el tiempo de perfusión de la 4-AP probablemente el calcio que entró sobreactivó a los receptores de NMDA y no es amortiguado por la célula, lo que hace a este catión partícipe directo en el proceso de muerte neuronal, ya que el bloqueo con antagonistas del receptor de glutamato NMDA, sí previene la neurodegeneración causada por 4-AP (Ayala y Tapia, 2003).

Además, estos antagonistas rescatan a las neuronas hipocampales de neurodegeneración aún 60 minutos después de la persistencia de las descargas epilépticas (Ayala y Tapia, 2005). En éste mismo sentido se demostró que el quelante de Ca^{2+} intracelular, BAPTA-AM, protege contra la neurodegeneración producida por la 4-AP.

En relación con el resultado negativo con la minociclina, más recientemente, se encontró que esta droga tampoco protegió contra el daño de tipo parkinsoniano producido por la administración de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) en el estriado de monos, ni contra el daño producto de la administración de ácido 3-nitropropiónico (3-NP) en un modelo fenotípico de la enfermedad de Huntington en ratones (Diguet y col., 2004), contrariamente a la efectividad encontrada en otros trabajos citados anteriormente (Chen y col., 2000; Du y col., 2001).

Otro aspecto importante a considerar no descarta la participación de factores que pudieran interferir con la neuroprotección, como lo son la vía de administración, la dosis, la especie animal y el modelo experimental. De hecho se conoce que la biodisponibilidad de la minociclina en el cerebro es considerablemente más alta en humanos que en roedores (Diguet y col., 2004). Éste mismo grupo, observó que una dosis de (10 μ M) de minociclina no disminuye la muerte neuronal producida por dosis mayores a (10 mM) de 3-NP en cultivo de células hipocámpales y corticales, de lo cual se concluye que el efecto protector que pudiera tener la minociclina se encuentra restringido a ciertas dosis y que los beneficios que puede ofrecer la droga son reducidos.

En este mismo sentido, la minociclina a dosis (10, 50 mg/kg i.p.) no es eficaz contra la intoxicación por 3-NP en el estriado de ratas tanto in vivo como in vitro. Además, se encontró que el tratamiento con minociclina no reduce el área lesionada ni tampoco modifica la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), indicando la incapacidad de esta tetraciclina para bloquear la degeneración que induce el 3-NP en el estriado, misma que involucra la pérdida de la actividad de dicha enzima (Bantubungi y col., 2005).

Es particularmente interesante mencionar, que mientras los hallazgos de estudios como los de Tikka y Koistinaho (2001a), sugieren que tanto el glutamato como los agonistas del receptor a glutamato del tipo NMDA inducen la activación de la microglía, otros trabajos como el de Bantubungi (2005), muestran que la minociclina no modifica la liberación ni del glutamato basal ni del inducido por el ácido quinolínico (AQ), cuando es administrado crónicamente en el estriado de ratas por microdiálisis, por lo que la minociclina no contrarresta la neurodegeneración causada en ésta región del cerebro. De éstos resultados se infiere que los posibles efectos protectivos y anti-inflamatorios del antibiótico podrían estar relacionados con la reducción en la liberación de glutamato.

De aquí que podemos pensar en la probabilidad de que la acción protectora de la minociclina no recaiga directamente sobre un efecto presináptico, sino más bien podría deberse a eventos anteriores a la liberación de glutamato y con ello se podría explicar la ausencia de la inhibición de glutamato encontrada en nuestro diseño experimental.

Por otro lado, no podemos descartar que el tipo de muerte que produce la 4-AP se encuentre mediado por un proceso necrótico y por esta razón la minociclina resultara insuficiente para prevenir o reducir la muerte, ya que al desencadenar preferentemente sus propiedades antiapoptóticas tales como la inhibición de caspasas y otros factores (Chen y col., 2000; Sanchez y col., 2001) a las cuales se le atribuye parte del mecanismo neuroprotector, no contrarreste la generación del daño provocado en nuestro modelo.

Por último, podríamos pensar también, que la ventana de tiempo en la que se administró la minociclina no ocupó un sitio adecuado dentro del potencial protector en la que esta droga actúa.

7. CONCLUSIONES

- La retigabina protege contra el daño neuronal, generado como consecuencia de un exceso en la liberación de glutamato endógeno de las terminales nerviosas en el hipocampo producido por la 4-AP in vivo. El mecanismo neuroprotectivo podría deberse a la capacidad de la retigabina para producir la apertura de canales de K^+ sensibles a voltaje que hiperpolarizan las terminales nerviosas y regular así, la liberación de neurotransmisores.
- La retigabina no contrarresta la actividad epileptogénica inducida por la 4-AP, probablemente por que la apertura de estos canales de K^+ sensibles a voltaje del tipo KCNQ2/3, no sea suficiente para contribuir en la disminución de dichas descargas.
- La estimulación de la liberación de glutamato juega un papel importante en la generación de las crisis inducidas por la 4-AP, pero no es el único factor que interviene en el desarrollo de estas descargas.
- La minociclina resultó insuficiente para proteger la neurodegeneración inducida por la 4-AP en el hipocampo, posiblemente debido a que el proceso inflamatorio no participa de forma determinante en el tipo de muerte desencadenado por la 4-AP.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amin, A., Attur, M., Thakker, G., Patel, P., Vyas, P., Patel, R., Patel, I., y Ambramson, S. 1996. A novel mechanism of action of tetracyclines: Effects on nitric oxide synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:1414-1419.
- Avoli, M., Barbarosie, M., Lücke, A., Nagao, T., Lopantsev, V., y Köhling, R. 1996. Synchronous GABA-mediated potentials and epileptiform discharges in the rat limbic system in vitro. *J Neurosci.* 16:3912-3924.
- Armand, V., Rundfeldt, C., y Heinemann, U. 1999. Effects of retigabine (D-23129) on different patterns of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat entorhinal cortex hippocampal slices. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 359:33-39.
- Ayala, G. X., y Tapia, R. 2003. Expression of heat shock protein 70 induced by 4-aminopyridine through glutamate-mediated excitotoxic stress in rat hippocampus in vivo. *Neuropharmacology.* 45:649-660.
- Ayala, G. X., y Tapia, R. 2005. Late *N*-methyl-D-aspartate receptor blockade rescues hippocampal neurons from excitotoxic stress and death after 4-aminopyridine-induced epilepsy. *Eur. J. Neurosci.* 22:3067-3076.
- Baimbridge, K. G., y Miller, J. J. 1982. Immunohistochemical localization of calcium-binding protein in the hippocampal formation and olfactory bulbo f the rat. *Brain Res.* 245:223-229.
- Bantubungi, K, Jacquard, C., Greco, A., Pintor, A., Chtarto, A., Tai, K., Galas, M-C, tenenbaum, L., Déglon, N., Popoli, P., Minghetti, L., Brouille,t E., Brotchi, J., Levivier, M., Schiffmann, S., y Blum, D. 2005. Minocycline in phenotypic models of Huntington's disease. *Neurobiol. Disease.* 18:206-217.
- Bargas J., Galarraga E., y Aceves J. 1989. An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp. Brain Res.* 75:146-156.
- Biervert, C., Schroeder, B. C., Kubisch, C., Berkovic, S. F., Proopping, P., Jentsch, T. J., y Steinlein, O. K. 1998. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279:403-406.

- Bittigau, P., e Ikonomidou, C. 1997. Glutamate in neurologic diseases. *J. Child Neurol.* 12:471-485.
- Blum, D., Chtarto, A., Tenenbaum, L., Brotchi, J., y Levivier, M. 2004. Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders. *Neurobiology of Disease.* 17:359-366.
- Bradford, H.F. 1995. Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog Neurobiol.* 47: 477-511.
- Brailowsky, S., Hirsch, E., y Marescaux, C .1997. Epilepsia, aspectos neurobiológicos, médicos y sociales. Ediciones del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Departamento de publicaciones científicas. Feria A, Martínez D y Rubio Francisco Cap. VI. pp 103-144.
- Brown, B. S., e Yu, S. P. 2000. Modulation and genetic identification of the M channel. *Prog. Bioph. Mol. Biol.* 73:135-166.
- Brückner, C., y Heinemann, U. 2000. Effects of standard anticonvulsant drugs on different patterns of epileptiform discharges induced by 4-aminopyridine in combined entorhinal cortex-hippocampal slices. *Brain Res.* 859:15-20.
- Chanday, K. G., y Gutman, G. A. 1995. Voltage-gated potassium channel genes, En: *Handbook of receptors and channels* (North, R.A: ed.) pp 1-71. CRC Press Inc. E.U.
- Chen, M., Ona, V., Li, M., Ferrante, R., Fink, K., Zhu, S., Bian, J., Guo, L., Farrell, L., Hersch, S., Hobbs, W., Vonsattel, J. P., Cha, J., y Friedlander, R. 2000. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nature Medicine.* 7: 797-801.
- Choi, D.W. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1:623-624.
- Contreras, D. 2000. Revisado en: Modelos experimentales en epilepsia. *Revista de Neurología.* 30:370-376.
- Cooper, E. C., Aldape, K. D., Abosch, A., Barbaro, N. M., Berger, M. S., Peacock, W. S, Jan Y. N., y Jan, L Y. 2000. Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. *Proc Natl Acad Sci.* 97:4914-4919.
- Cooper, E.C., Harrington, E., Jan, Y. N., y Jan, L. Y. 2001. M channel KCNQ2 subunits are localized to key sites for control of neuronal network oscillations and synchronization in mouse brain. *J Neurosci.* 21:9529-9540.

- Daikhin, Y., e Yudkoff, M. 2000. Glutamate and glutamina in the brain. *J Nutr.* 130: 1026S-1031S.
- Dailey, J. W., Cheong, J. H., Ko, K. H., Adams-Curtis, L. E., y Jobe, P. C. 1995. Anticonvulsant properties of D-20443 in genetically epilepsy-prone rats: prediction of clinical response. *Neurosci. Lett.* 195:77-80.
- De Sarro, G., Di Paola, E. D., Conte, G., Pasculli, M. P., y De Sarro, A. 2001. Influence of retigabine on the anticonvulsant activity of some antiepileptic drugs against audiogenic seizures in DBA/2 mice. *Naunyn Schimiedeberg's Arch. Pharmacol.* 363:330-336.
- Diguet, E., Fernagut, P-O., Wei, X., Du, Y., Rouland, R., Gross, C., Bezard, E., y Tison, F. 2004. Deleterious effects of minocycline in animal models of Parkinson's disease and Huntington's disease. *Eur. J. Neurosci.* 19:3266-3276.
- Doble, A. 1999. The role of excitotoxicity in neurodegenerative diseases: implications for therapy. *Pharmacol. Ther.* 81:163-221.
- Dolly, J. O., y Parcej, D. N. 1996. Molecular properties of voltaje-gated K⁺ channels. *J Bioenerg Biomembr.* 28:231-253.
- Domerq, M., y Matute, C. 2004. Neuroprotection by tetracyclines. *TRENDS in Pharmacol Sciences.* 12:609-612
- Dost, R., y Rundfeldt, C. 2000. The anticonvulsant retigabine potently suppresses epileptiform discharges in the low Ca⁺⁺ and low Mg⁺⁺ model in the hippocampal slice preparation. *Epilepsy Res.* 38:53-66.
- Du, Y., Ma, Z., Lin, S., Dodel, R., Gao, F., Bales, K., Triarhou, L., Chernet, E., Perry, K., Nelson, D., Luecke, S., Phebus, L., Bymaster, F., y Paul, S. 2001. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *PNAS.* 25:14669-14674.
- Ebert, U., Brandt, C., y Loscher, W. 2002. Delayed sclerosis, neuroprotection, and limbic epileptogenesis after status epilepticus in the rat. *Epilepsia* 43 (Suppl. 5):86-95.
- Ekdahl, C. T., Mohapel, P., Elmer, E., y Lindvall, O. 2001. Caspase inhibitors increase short-term survival of progenitor-cell progeny in the adult rat dentate gyrus following status epilepticus. *Eur. J. Neurosci.* 14:937-945.

- Ekdahl, C. T., Claassen, J-H, Bonde, S., Kokaia, Z., y Lindvall, O. 2003. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. PNAS. 2234031100:1-6
- Fieles, W. E., Smith, J., Christian, E. P., Cross, A., y Mrzljak, L. 2002. Subcellular localization of KCNQ2 potassium channel subunit in the macaque monkey cerebral cortex and hippocampus. Soc Neurosci Abstr 28:438.
- Fragoso-Veloz, J., Massieu, L., Alvarado, R., y Tapia, R. 1990. Seizures and wet-dog shakes induced by 4-aminopyridine, and their potentiation by nifedipine. Eur. J. Pharmacol. 178:275-284.
- Fragoso-Veloz, J., y Tapia, R. 1992. NMDA receptor antagonists Project against seizures and wet-dog shakes induced by 4-aminopyridine. Eur.J. Pharmacol. 221:275-280.
- Gean, M. E. 1990. The epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat amygdale slices: antagonism by non-N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. Brain Res. 530:251256.
- Grooms, S. Y., Ortiz, T., Bennett, M. V., y Zukin, R.S. 2000. Status epilepticus decreases glutamate receptor 2 mRNA and protein expression in hippocampal pyramidal cells before neuronal death. Proc Natl Acad Sci. USA. 97:3631-3636.
- Hernández-Collados, A y Sánchez-Turet, M. 1997. Revisado en: Conceptos básicos de la teoría electroencefalográfica. Revista de Neurología. 25:1624-8.
- Hetka, R., Rundfeld, C., Heinemann, U., y Schmitz, D. 1999. Retigabine strongly reduces repetitive firing in rat entorhinal cortex. Eur. J. Pharmacol. 386:165-171.
- Hoffman, D. A., Magee, J. C., Colbert, C.M., y Johnston, D. 1997. K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. Nature. 387:869-875.
- Jentsch, T. J. 2000. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. Nat. Rev. Neurosci. 1:21-30.
- Johnston, D., y Amaral, D.G. 1998. Hippocampus. En: The synaptic organization of the brain. (Sheperd G. M. Ed.), Oxford University Press, New York. pp 417-458.
- Kandel E., Schwartz, J., y Jessell, T. 2001. Principios de Neurociencia. McGraw-Hill Interamericana. Cuarta edición. pp 1400.

- Kapetanovic, I. M., Yonekawa, W. D., y Kupferberg, H. J. 1995. The effects of D-23129, a new experimental anticonvulsant drug, on neurotransmitter amino acids in the rat hippocampus in vitro. *Epilepsy Res.* 22:167-173.
- Klein, M., Calderon, S., y Hayes, B. 1999. Abuse liability assessment of neuroprotectants. *Ann NY Acad Sci.* 890:515-525.
- Kriz, J., Nguyen, M. D., y Julien, J. 2002. Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Disease.* 10:268-278.
- Leppert, M., y Singh, N. 1999. Benign familial neonatal epilepsy with mutations in two potassium channel genes. *Curr. Opin. Neurol.* 12:143-147.
- Liu, B., y Hong, J. 2003. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304:1-7.
- Main, M., Cryan, J. E., Dupere, J., Cox, B., Clare, J., y Burbidge, S. 2000. Modulation of KCNQ2/3 potassium channels by the novel anticonvulsant retigabine. *Mol. Pharmacol.* 58:253-262.
- Mannaioni, G., Marino, M. G., Valeti, O., Traynelis, S. F., y Conn, P. J. 2001. Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function. *J Neurosci.* 21:5925-5934.
- Martire, M., Castaldo, P., D'Amico, M., Preziosi, P., Annunziato, L., y Tagliatella, M. 2004. M Channels containing KCNQ2 subunits modulate norepinephrine, aspartate and GABA release from hippocampal nerve terminals. *J. Neurosci.* 24:592-597.
- Massieu, L. 1999. Muerte por excitotoxicidad. En: *Enfermedades neurodegenerativas, mecanismos celulares y moleculares.* (Pasantes H, Arias C, Massieu L, Zentella A, Tapia, R). Fondo de Cultura Económica. México, D.F. pp 64-80.
- Mehler, M., y Gokhan, S. 2001. Developmental mechanisms in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Progress in Neurobiology.* 63:337-363.
- Medina-Ceja L, Morales-Villagran A., y Tapia, R. 2000. Action of 4-aminopyridine on extracellular amino acids in hippocampus and entorhinal cortex: a dual microdialysis and electroencephalographic study in awake rats. *Brain Res Bull.* 53:255-62.

- Meldrum, B. 1991. Excitotoxicity and epileptic brain damage. *Epilepsy Res.* 10:55-61.
- Meldrum, B. 1995. Neurotransmission in epilepsy. *Epilepsia* 36, Suppl. 1, S 30-S35.
- Meldrum, B. 2000. Glutamate as neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130:1007S-1015S.
- Morales-Villagrán, A., y Tapia, R. 1996. Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo. *Neurochem. Int.* 28:35-40.
- Morimoto, K., Murasugi, T., y Oda, T. 2002. Acute neuroinflammation exacerbates excitotoxicity in rat hippocampus in vivo. *Experimental Neurology.* 117, 95-104.
- Muñoz, D.G. 1990. The distribution of chromogranin A-like immunoreactivity in the human hippocampus coincides with the pattern of resistance to epilepsy-induced neuronal damage. *Ann Neurol.* 27:266-275.
- Nakanishi, S. 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597-603.
- Nakanishi, S. 1994. Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation and plasticity. *Neuron* 13:1031-37.
- Noble, J. F., Kanegis, L. A., y Hallesy, D. W. 1967. Short-term toxicity and observations on certain aspects of the pharmacology of unique tetracycline-minocycline. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 11: 128-149.
- Olney, J.W, Ho, O.L., y Rhee, V. 1971. Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids an the infant mouse central nervous system. *Exp brain Res.* 14:61-70.
- Olney, J.W., e Ishimaru, M.J. 1999. Excitotoxic cell death. The "Cell death and diseases of nervous system". Editado por Koliatsos y Ratan: Humana Press. 10:197-219.
- Pasantes, H., Sánchez, J., y Tapia, R. 1991. En: *Neurobiología celular*, Fondo de Cultura Económica, México, D.F. cap. I, III, VI, VII, VIII y IX.
- Paxinos, G., y Watson, CH. 1982. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, Sydney.
- Peña, F., y Tapia, R. 1999a. El ácido glutámico y las enfermedades neurodegenerativas. *CIENCIA. Perspectivas.* 4:5-13.

- Peña, F., y Tapia, R. 1999b. Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: A microdialysis and electroencephalographic study. *J. Neurochem.* 72:2006-2014.
- Peña, F., y Tapia, R. 2000. Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience* 101:547-561.
- Peña, F. 2001. Papel del glutamato en la epilepsia y la neurodegeneración producidas por la 4-aminopiridina en el hipocampo in vivo. Tesis de doctorado. UNAM.
- Peña, F., Bargas, J., y Tapia, R. 2002. Paired pulse facilitation is turned into paired pulse depression in hippocampal slices after epilepsy induced by 4-aminopyridine in vivo. *Neuropharmacology* 42:807-812.
- Pitkänen, A. 2002. Efficacy of current antiepileptics to prevent neurodegeneration in epilepsy models. *Epilepsy Research.* 50:141-160.
- Pongs, O., Leicher T., Berger, M., Roeper, J., Bähring, R., Wray, D., Giese K., Silva, A., y Storm J. 1999. Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel β units. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868:344-355.
- Ramírez-Munguía, N., Vera, G., y Tapia, R. 2003. Epilepsy, neurodegeneration and extracellular glutamate in the hippocampus of awake and anesthetized rats treated with okadaic acid. *Neurochem. Res.* 28:1517-1524. Rocha L. 1997. Microdiálisis. Sociedad mexicana de ciencias fisiológicas. México, D.F. pp 142.
- Rocha, L. 1997. Microdiálisis. Sociedad mexicana de ciencias fisiológicas. México, D.F. pp 142.
- Rogawski, M. A. 2000. KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels and the molecular pathogenesis of epilepsy: implications for therapy. *Trends Neurosci.* 23:393-398.
- Rostock, A., Tober, C., Rundfeldt, C., Bartsch, R., Engel, J., Polymeropoulos, E., Kutscher, B., Löscher, W., Hönack, D., White, H.S., y Wolf, H. H. 1996. D-23129: a new anticonvulsant with a broad spectrum activity in animal models of epileptic seizures. *Epilepsy Res.* 23:211-223.
- Rudy, B. 1999. Contributions of Kv3 channels to neuronal excitability. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868:304-343.

- Rundfeldt, C., Rohlf, A., y Netzer, R. 1995. Multiple actions of the new anticonvulsant D-23129 on voltage-gated inward currents and GABA-induced currents in cultured neuronal cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 351 (Suppl.), R160.
- Rundfeldt, C. 1997. The new anticonvulsant retigabine (D-23129) acts as an opener of K^+ channel in neuronal cells. *Eur. J. Pharmacol.* 336:243-249.
- Rundfeldt, C. 1999. Characterization of the K^+ channel opening effect of the anticonvulsant retigabine in PC12 cells. *Epilepsy Res.* 35:99-107.
- Rundfeldt, C., y Netzer, R. 2000a. The novel anticonvulsant retigabine activates M-currents in Chinese hamster ovary-cells transfected with human KCNQ2/3 subunits. *Neurosci. Lett.* 282:73-76.
- Rundfeldt, C., y Netzer, R. 2000b. Investigations into the mechanism of action of the new anticonvulsant retigabine. Interaction with GABAergic and glutamatergic neurotransmission and with voltage gated ion channels. *Arzneimittelforschung* 50: 1063-1070.
- Salazar, P., Montiel, T., Brailowsky, S., y Tapia, R. 1994. Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of γ -aminobutyric acid. *Neurochem. Int.* 24:363-368.
- Salazar, P., Tapia, R., y Rogawski, M. A. 2003. Effects of neurosteroids on epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in the rat hippocampal slice. *Epilepsy Res.* 55:71-82.
- Sanchez, R., Ona, V., Li, M., y Friedlander, R. 2001. Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction. *Neurosurgery.* Vol.48 No.6 pp 1393-1401.
- Seyfried, J., Evert, B. O., Rundfeldt, C., Schulz, J., Kovar, K. A., Klockgether, T., y Wüllner, U. 2000. Flupirtine and retigabine prevent L-glutamate toxicity in rat pheochromocytoma PC 12 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 400:155-166.
- Sills, G., Rundfeldt, C., Butler, E., Forrest, G., Thompson, G., y Brodie, M. 2000. A neurochemical study of the novel antiepileptic drug retigabine in mouse brain. *Pharmacol. Res.* 42:553-557.
- Siman, R., Noszek, J. C., y Kegerise, C. 1989. Calpain I activation is specifically related to excitatory amino acid induction of hippocampal damage. *J Neurosci.* 9:1579-1590.

- Spyker, D. A., Lynch, C., Shabanowitz, J., y Sinn, J. A. 1980. Poisoning with 4-aminopyridine: report of three cases. *Clin. Toxicol.* 16:487-497.
- Storm, J. F. 1993. Functional diversity of K⁺ currents in hippocampal pyramidal neurons. *The Neurosciences.* 5:79-92.
- Tapia, R., y Sitges, M. 1982. Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* 250:291-299.
- Tapia, R., Sitges, M., y Morales, E. 1982. Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Brain Res.* 361, 373-382.
- Tapia, R. 1999. Muerte por estrés oxidativo: radicales libres y óxido nítrico (NO). En: *Enfermedades neurodegenerativas, mecanismos celulares y moleculares.* (Pasantes H, Arias C, Massieu L, Zentella A, Tapia R), Fondo de Cultura Económica, México, D.F., pp 56-63.
- Tapia, R., Medina-Ceja, L., y Peña, F. 1999. On the relationships between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo. *Neurochem. Int.* 34:23-31.
- Tatulian, L., Delmas, P., Abogadie, F. C., y Brown, D. A. 2001. Activation of expressed KCNQ potassium currents and native neuronal M-type potassium currents by the anti-convulsant drug retigabine. *J. Neurosci.* 21:5535-5545.
- Thesleff, S. 1980. Aminopyridines and synaptic transmission. *Neurosci.* 5:1413-1419.
- Tikka, T., y Koistinaho, J. 2001a. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J. Immunol.* 166: 7527-7533.
- Tikka, T., Fiebich, B., Goldsteins, G., Keinänen, R., y Koistinaho, J. 2001b. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity activation and proliferation of microglia. *J. Neurosci.* 21:2580-2588.
- Tober, C., Rostock, A., Rundfeldt, C., y Bartsch, R. 1996. D-23129: a potent anticonvulsant in the amygdala kindling model of complex partial seizures. *Eur. J. Pharmacol.* 303:163-169.
- Velasco, A., Martínez, D., y Rubio, F. 1997. *Epilepsia, aspectos neurobiológicos, médicos y sociales.* Ediciones del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Departamento de Publicaciones Científicas pp. 426.

- Vera, G. 2004. Protección paradójica de la excitotoxicidad glutamatérgica por acumulación de glutamato extracelular en el hipocampo de la rata, in vivo. Tesis de licenciatura. UNAM.
- Versteeg, D. H. G., Heemskerk, F. M. J., Spiereburg, H. A., de Graan, P. N. E., y Schrama, L. H. 1995. 4-Aminopyridine differentially affects the spontaneous release of radiolabelled transmitters from rat brain slices in vitro. *Brain Res.* 686:233-238.
- Wang, H. S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B. S., Wymore, R. S., Cohen, I. S., Dixon, J. E., y Mckinnon, D. 1998. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of M-channel. *Science* 282:1890-1893.
- Wickenden, A. D. 2002. Potassium channels as anti-epileptic drugs targets. *Neuropharmacology.* 43:1055-1060.
- Xu, L., Fagan, S., Waller, J., Edwards, D., Borlongan, C., Zheng, J., Hill, W., Feuerstein, G., y Hess D. 2004. Low dose intravenous minocycline is neuroprotective after middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats. *BMC Neurology.* 4:1-7.
- Yamaguchi, S., y Rogawski, M. A. 1992. Effects of anticonvulsant drugs on 4-aminopyridine induced seizures in mice. *Epilepsy Res.* 11:9-16.
- Yonekawa, W. D., Kapetanovic, I. M., y Kupferberg, H. J. 1995. The effects of anticonvulsant agents on 4-aminopyridine induced epileptiform activity in rat hippocampus in vitro. *Epilepsy Res.* 20:137-150.
- Yrjänheikki, J., Keinänen, R., Pellikka, M., Hökfelt, T., y Koistinaho, J. 1998. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:1576-15774.
- Yrjänheikki, J., Tikka, T., Keinänen, R., Goldsteins, G., Chan, P.H., y Koistinaho, J. 1999. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *PNAS.* 96:13496-13500.
- Zhu, S., Stavrovskaya, I.G, Drozda, M., Kim, B., Ona, V., Satinder, M.L., Liu, A., Hartley, D.M., Wu, D., Gullans, S., Ferrante, R., Przedborski, S., Kristal, B.S., y Friedlander, R. 2002. Minocycline inhibits cytochrome C release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature.* 417: 74-78.