



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE MEDICINA

### LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

“ Caracterización de los efectos de varios fármacos antiepilépticos sobre la liberación de glutamato estimulada por 4-aminopiridina en terminales nerviosas aisladas de hipocampo. Comparación con el efecto de la vinpocetina ”

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
Licenciado en Investigación Biomédica Básica

P R E S E N T A:  
BERARDO MANUEL SÁNCHEZ TAFOLLA

DIRECTORA: DRA. MARÍA SITGES BERRONDO



CIUDAD UNIVERSITARIA, MARZO 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **Agradecimientos:**

A la Dra. María Sitges Berrondo, por darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación en su laboratorio, por sus enseñanzas y su gran paciencia, así como por asesorarme durante la escritura de esta tesis.

A la Biol. Luz María Chiu Velázquez, por su constante asesoramiento y atención, desde mi primer día en el laboratorio. Por enseñarme a realizar las metodologías aplicadas en esta investigación, particularmente los experimentos para el seguimiento de liberación de glutamato.

A los miembros del Jurado: Dra. Carolina Escobar Briones, Dra. Lourdes Massieu Trigo, Dra. Clorinda Arias Álvarez y Dra. Herminia Pasantes Ordóñez, por sus valiosas observaciones y contribuciones a este trabajo de tesis.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por el otorgamiento de una beca durante mis estudios, dentro del proyecto PAPIIT clave IN225708.

## **Agradecimientos:**

A mis papás, José y Catarina, por apoyarme y darme todo para formarme cada día como hijo, como estudiante y como persona. Este trabajo es para ustedes.

A mis hermanos, Carolina y Leonardo, por ser mis compañeros de toda la vida. Los quiero mucho.

A cada uno de mis verdaderos amigos. Por aguantarme y cambiar para bien mis días desde que tuve la fortuna de conocerlos. Gracias por estar conmigo.

A la UNAM, por ser mi segundo hogar por más de diez años. Por enseñarme mi camino y darme el lugar y las herramientas para dedicarme a la actividad tan noble que es la ciencia. A mis profesores, por su excelente enseñanza durante mi licenciatura.

A mis compañeros de laboratorio, por hacer mi estancia provechosa y llena de aprendizaje. Gracias también por todos los buenos momentos.

A la Dra. Irma Romero Álvarez, por ser mi tutora durante mi primer año de la Licenciatura. A los miembros del Laboratorio 2 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina. Aquí di mis primeros pasos formales en la ciencia y me enamoré por completo de esta actividad.

Al Dr. Georges Dreyfus Cortés y a los miembros de su laboratorio. De manera muy especial al Dr. Francisco Javier de la Mora, por su paciencia conmigo y por enseñarme tantas cosas.

A mis compañeros de la LIBB. No podría tener mejores compañeros que ustedes para iniciar en este viaje mágico y misterioso. Cada uno de ustedes es especial para mí.

A los músicos y compositores de ayer y hoy, que me han acompañado y han llenado de sonidos la historia de mi vida y sus momentos. También se la dedico a todos ustedes.

## **Resumen**

**Antecedentes y objetivo:** La 4-aminopiridina (4-AP) es un agente convulsivo que *in vivo* libera preferentemente glutamato, el neurotransmisor excitador más importante en el cerebro. La vinpocetina es un fármaco con potencial antiepiléptico que previamente se encontró que inhibe el aumento en la concentración interna de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por 4-AP en terminales nerviosas cerebrales aisladas. En el trabajo experimental del presente estudio se comparó el efecto de la vinpocetina con el de varios de los fármacos antiepilépticos que comúnmente se utilizan en la clínica, sobre la liberación del neurotransmisor glutamato inducida por el agente convulsivo 4-AP, en terminales nerviosas aisladas de hipocampo.

**Metodología:** Las terminales nerviosas fueron cargadas con glutamato marcado radiactivamente ( $^3\text{H}$ Glu), colocadas en filtros dentro de cámaras multi-perforadas y perfundidas con medio fisiológico en presencia o ausencia de:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , tetrodotoxina (TTX), vinpocetina o un fármaco antiepiléptico (carbamazepina, fenitoina, lamotrigina, oxcarbazepina o topiramato). El medio perfundido fue recolectado en intervalos de 1 min. A continuación el medio se sustituyó por uno que contenía además 4-AP y se recolectó durante varios minutos más. El  $^3\text{H}$ Glu liberado se cuantificó usando un contador de centelleo.

**Resultados:** La liberación de  $^3\text{H}$ Glu inducida por 4-AP es dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , sensible a TTX y reducida de manera dosis-dependiente por la vinpocetina y los fármacos antiepilépticos probados. Es importante señalar que, mientras a una concentración de  $25\mu\text{M}$  la vinpocetina inhibió completamente la liberación de  $^3\text{H}$ Glu inducida por 4-AP  $500\mu\text{M}$ , los fármacos antiepilépticos carbamazepina, fenitoina, lamotrigina y oxcarbazepina redujeron dicha respuesta en 40-50% y el topiramato, únicamente un 20% en la dosis más alta probada de cada fármaco ( $750\mu\text{M}$ ).

**Conclusiones:** La reducción en la liberación de glutamato, bajo condiciones en donde la permeabilidad de los canales iónicos presinápticos involucrados en su liberación está comprometida, puede contribuir de manera importante a la acción anticonvulsiva de los fármacos probados. Por otra parte, considerando que las altas dosis de los fármacos antiepilépticos requeridas para el control de las convulsiones frecuentemente están acompañadas de efectos secundarios adversos, la mayor potencia y eficacia de la vinpocetina para inhibir la liberación del principal y más abundante neurotransmisor excitador cerebral puede ser ventajosa para el tratamiento de la epilepsia.

# CONTENIDO

<b>I. Antecedentes Generales</b>	
I.1. Epilepsia .....	7
I.2. Fármacos antiepilépticos .....	9
I.3. Vinpocetina .....	13
I.4. Estrategias experimentales para el estudio de las convulsiones .....	16
I.5. 4-Aminopiridina .....	19
I.6. Glutamato .....	22
<b>II. Conceptos</b>	
II.1. Distribuciones iónicas en las células excitables .....	25
II.2. La preparación sinaptosomal .....	27
II.3. Principio del método de detección del neurotransmisor liberado .....	29
II.4. Utilidad del mecanismo de inactivación por recaptura .....	30
<b>III. Caracterización de los efectos de varios fármacos antiepilépticos sobre la liberación de glutamato estimulada por 4-aminopiridina en terminales nerviosas aisladas de hipocampo. Comparación con el efecto de la vinpocetina.</b>	
III.1. Introducción .....	32
III.2. Metodología .....	34
III.3. Resultados .....	40
III.4. Discusión .....	51
<b>IV. Referencias .....</b>	<b>56</b>

Existe una necesidad clínica no cubierta en el tratamiento de la epilepsia, pues los fármacos antiepilépticos utilizados, a pesar de que controlan las convulsiones, frecuentemente producen efectos secundarios adversos. Esto se suma a que aproximadamente un tercio de los pacientes epilépticos son refractarios a los mismos. Con el propósito de encontrar nuevas opciones, desde hace varios años en el laboratorio de la Dra. María Sitges se ha investigado a la vinpocetina, un fármaco neuroprotector que presenta un alto interés como antiepiléptico.

En el trabajo experimental de la presente investigación se comparó el efecto de la vinpocetina con el de varios de los fármacos antiepilépticos que comúnmente se utilizan en la clínica sobre la liberación del neurotransmisor excitador por excelencia, glutamato, inducida por el agente convulsivo 4-aminopiridina (4-AP) en terminales nerviosas aisladas de hipocampo.

La presente tesis está organizada como sigue. Primero se incluye una sección de "Antecedentes generales" en la que se describen algunas características de la epilepsia y se mencionan de manera muy breve a algunos de los fármacos antiepilépticos utilizados. Le sigue un apartado que describe los efectos de la vinpocetina, así como el mecanismo de acción de la 4-AP, particularmente a nivel de las terminales nerviosas cerebrales aisladas. Al final de esta sección también se exponen algunos conceptos que se consideraron relevantes para la mejor comprensión de la metodología. Enseguida se presenta una introducción del trabajo de investigación propiamente dicho y se describen los resultados obtenidos, para finalizar con una discusión de los mismos.

# I. Antecedentes Generales

## I.1. Epilepsia

La epilepsia es una alteración neurológica multifactorial que se caracteriza por la aparición recurrente de crisis epilépticas no provocadas (ILAE, 1993). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud y la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE, 1993), una crisis epiléptica puede definirse como un episodio de actividad neuronal excesiva y sincrónica de un grupo de neuronas en el cerebro. La manifestación clínica de este evento consiste en alteraciones transitorias y súbitas de la conciencia, motoras, sensoriales, autonómicas y conductuales, en la mayoría de los casos perceptibles por el paciente o por un observador. A diferencia de una crisis epileptiforme, que puede ser un síntoma reactivo de una condición cerebral aguda (como fiebre o trauma, por ejemplo), una crisis epiléptica ocurre sin una causa identificada inmediata que la desencadene.

Se calcula que el 10% de la población desarrolla algún tipo de crisis epileptiforme a lo largo de su vida y que la prevalencia a nivel mundial de la epilepsia es entre 1-2% de la población (WHO, 2008), aunque en muchos casos este valor es subestimado dado que existe un gran número de personas con epilepsia que son reacias a dar a conocer su condición por las consecuencias psicosociales asociadas a la enfermedad, como estigmas y prejuicios derivados de la desinformación (Couldridge *et al.*, 2001). Asimismo, la epilepsia se presenta de forma asintomática la mayor parte del tiempo y en muchas ocasiones la falta de conocimiento de los médicos no especialistas dificulta el diagnóstico de la enfermedad.

Es importante señalar que la prevalencia de la epilepsia aumenta de forma considerable en los países en vías de desarrollo como consecuencia de diversos aspectos sociales, culturales y económicos (revisados por Bharucha y Shorvon, 1997).

Por ejemplo, estos países muchas veces no cuentan con un sistema de salud adecuado y accesible para toda la población, además de existir un reducido acceso a estrategias como la neuroimagenología o el monitoreo de los tratamientos contra la epilepsia que permiten detectar y tratar el padecimiento con mayor efectividad. Como resultado, una gran proporción de personas con epilepsia en los países en desarrollo no reciben tratamiento alguno o bien, es inadecuado. En un estudio realizado en México en 1994 se encontró que la prevalencia de la epilepsia en una muestra de la población adulta fue de 3.7% (Caraveo *et al.*, 1994), lo cual puede representar varios millones de personas con epilepsia en el país.

Al estudiar detalladamente el origen de las crisis epilépticas, la región cerebral donde se ha observado mayor sensibilidad frente al daño y mayor susceptibilidad a la aparición de convulsiones es la localizada en el lóbulo temporal del cerebro, donde se calcula que se originan más del 50% de las crisis epilépticas parciales. Particularmente el origen de estas crisis se ha localizado en las estructuras que forman el sistema límbico. El sistema límbico es un centro de formación y procesamiento de emociones, aprendizaje y memoria. Está formado por estructuras que incluyen al hipotálamo, el tálamo anterior, la corteza cingulada, el hipocampo y la amígdala (Macleay, 1952). La alta susceptibilidad que se presenta en estas estructuras a la aparición de crisis epilépticas posiblemente se debe a los bajos umbrales requeridos para activar los potenciales de acción de las membranas neuronales. En un estudio de Zilberter (2007) se comparó el umbral de activación del potencial de acción del hipocampo y de la corteza en células piramidales (las principales neuronas constituyentes de ambas estructuras) de rebanadas de cerebro y encontró que las células piramidales de la región *cornu ammonis* (CA1) del hipocampo tienen un umbral de activación del potencial de acción membranal mucho menor que las células neocorticales L2/3, de 5 a 7 veces menor.

## I.2. Fármacos Antiepilépticos

El término “fármaco antiepiléptico” ha sido adoptado a lo largo de la historia aunque específicamente se trata únicamente de fármacos con capacidad anti-convulsiva (Porter y Meldrum, 1997).

Un fármaco antiepiléptico es, en términos generales, un fármaco que, administrado durante un periodo prolongado de tiempo, disminuye la incidencia y severidad de las crisis epilépticas (Macdonald y Meldrum, 1989).

El objetivo final de un fármaco antiepiléptico es modificar las propiedades de disparo de las neuronas y disminuir su capacidad de sincronización dentro de arreglos neuronales. Algunos fármacos también pueden inhibir la propagación de la actividad neuronal excesiva hacia regiones diferentes al sitio donde se inicia la crisis epiléptica. La mayoría de los fármacos antiepilépticos previenen las convulsiones al actuar sobre uno o más de los siguientes blancos del sistema nervioso central:

- 1) Canales iónicos dependientes de voltaje, involucrados en la generación de potenciales de acción y en la liberación de neurotransmisores.
- 2) Neurotransmisión glutamatérgica excitadora.
- 3) Neurotransmisión GABAérgica (ácido  $\gamma$ -amino butírico) inhibitoria.

En la **Tabla 1**, adaptada de la revisión de Rogawski y Löscher (2004), se enlistan los mecanismos de acción propuestos para controlar las convulsiones de los fármacos antiepilépticos más comúnmente utilizados en la clínica.

**Tabla 1: Fármacos antiepilépticos y sus blancos moleculares**

<u>Fármaco</u>	<u>Canales de Na<sup>+</sup></u>	<u>Canales de Ca<sup>2+</sup></u>	<u>Sistema de GABA</u>	<u>Receptores de glutamato</u>
<b>Canales iónicos</b>				
Carbamazepina	I <sub>NaF</sub>			
Fenitoina	I <sub>NaF</sub> , I <sub>NaP</sub>			
Oxcarbazepina	I <sub>NaF</sub>			
Lamotrigina	I <sub>NaF</sub>	HVA		
Zonisamida	I <sub>NaF</sub>	Tipo-T		
<b>Combinado o poco identificado</b>				
Topiramato	I <sub>NaF</sub> <sup>*</sup> , I <sub>NaP</sub> <sup>*</sup>	HVA	GABA <sub>A</sub> R	KA / AMPA
Valproato	I <sub>NaF</sub> , I <sub>NaP</sub>	Tipo-T*	↑ Recaptura	
Felbamato	I <sub>NaF</sub>	HVA	GABA <sub>A</sub> R	NMDA
Etosuximida	I <sub>NaP</sub> <sup>*</sup>	Tipo-T		
Gabapenitna		HVA	↑ Recaptura	
Leviracetam		HVA	GABA <sub>A</sub> R	
Fenobarbital		HVA	GABA <sub>A</sub> R	AMPA
<b>Sistemas GABA-érgicos</b>				
Benzodiazepinas			GABA <sub>A</sub> R	
Vigatrabina			GABA-TA	
Tiagabina			GAT-1	

“\*”: Aun en discusión, “I<sub>NaF</sub>”: Corriente rápida de Na<sup>+</sup>, “I<sub>NaP</sub>”: Corriente persistente de Na<sup>+</sup>, “GABA<sub>A</sub>R”:Receptor de GABA tipo A, “GABA-TA”: GABA transaminasa, “GAT-1”: Transpostador de GABA tipo-1.

Sin embargo, aunque los fármacos antiepilépticos disponibles son capaces de disminuir la intensidad y frecuencia de las convulsiones, cuando menos en el 70 % de los pacientes epilépticos, no curan ni interfieren con el desarrollo progresivo de la epilepsia, ni previenen su aparición. En otras palabras, hasta la fecha ningún fármaco antiepiléptico ha demostrado ser efectivo para alterar el curso natural de la enfermedad. Aunque se puede recurrir a la cirugía en aquellos casos severos de epilepsia en los que la región cerebral donde se inician las crisis es limitada y claramente localizada, el tratamiento fundamental y más común contra la epilepsia sigue siendo el farmacológico ya que sólo un reducido

porcentaje de los pacientes con epilepsia son candidatos a ser intervenidos quirúrgicamente (Engel *et al.*, 1997).

Por otra parte, los pacientes sometidos a los tratamientos farmacológicos actuales deben tomar su medicación de forma continua durante muchos años, incluso de por vida, y las altas dosis requeridas de dichos fármacos para el control de las convulsiones generalmente producen efectos secundarios adversos, que incluyen alteraciones de tipo cognitivo, motor, conductual y auditivo (Vermeulen y Aldenkamp, 1995; Gates, 2000; Sitges y Nekrassov, 2007), entre muchos otros, que se enlistan en la **Tabla 2**.

### **Tabla 2: Efectos secundarios adversos frecuentes de los fármacos antiepilépticos**

#### **Efectos agudos**

- Mareo
- Somnolencia / Insomnio
- Irritabilidad
- Ataxia
- Vértigo
- Fatiga
- Fiebre
- Déficit de atención
- Diplopía

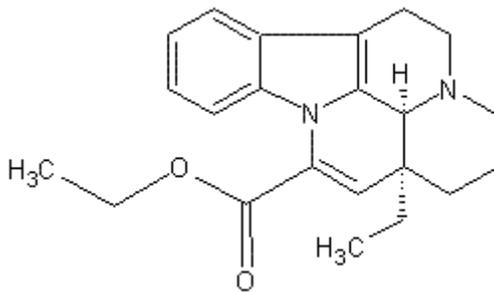
#### **Efectos crónicos**

- Disquinesias
- Dermatitis alérgica
- Aumento / pérdida de peso
- Anemia aplásica
- Disfunción renal
- Disfunciones hepáticas
- Osteopenia
- Disminución en capacidades sensoriales
- Aumento en el riesgo a padecer algunos tipos de cáncer

Es por ello que existe la necesidad de disponer de fármacos más eficaces y específicos para el control de las convulsiones y que carezcan de efectos secundarios adversos. Con este propósito, en los últimos años se ha intentado encontrar nuevos compuestos con acción anticonvulsiva. Los fármacos antiepilépticos desarrollados más recientemente desafortunadamente también producen efectos secundarios adversos graves y en su mayoría no son más que derivados de los fármacos anteriores. Dentro de los esfuerzos realizados en este sentido, en el laboratorio de la Dra. María Sitges se han investigado a varios niveles de complejidad los efectos de la vinpocetina, un fármaco con alto potencial anticonvulsivo, y se han comparado con los efectos de los fármacos antiepilépticos de primera línea.

### I.3. Vinpocetina

La vinpocetina (etil-apovincamina-22-oato) es un compuesto descubierto en la década de 1960, sintetizado por primera vez en el laboratorio por Lörincz *et al.* (1976) a partir del alcaloide vincamina, obtenido de las hojas de la planta *Vinca minor*. Desde su introducción al mercado en 1978 bajo el nombre de Cavinton, la vinpocetina ha sido utilizada exitosamente en muchos países para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares del sistema nervioso central y contra alteraciones de la memoria.



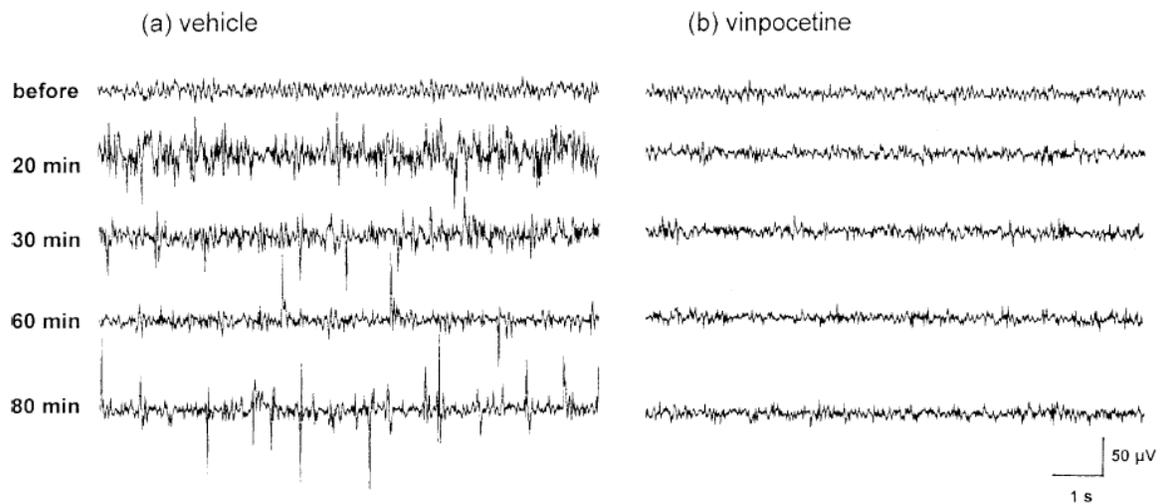
Estructura de la vinpocetina.



*Vinca minor*

La vinpocetina es un fármaco que también ha demostrado producir un efecto neuroprotector en varios modelos experimentales. Por ejemplo, es capaz de reducir el daño neuronal inducido por hipoxia (King, 1987) e isquemia (Sauer *et al.*, 1988), además de inhibir el efecto citotóxico del glutamato en neuronas cerebrocorticales (Miyamoto *et al.*, 1989).

En experimentos *in vivo* la vinpocetina presenta efecto anticonvulsivo e inhibidor de la actividad cortical epileptiforme inducida por los agentes convulsivos, pentilentetrazol y 4-aminopiridina (Nekrassov y Sitges, 2004; Sitges y Nekrassov, 2004). Como muestra de esto, en la Figura 1a, tomada de Sitges y Nekrassov (2004), se ilustra la actividad cortical epileptiforme inducida por 4-AP antes (before) y a los tiempos indicados después de la administración de 4-AP a una dosis de 2 mg/kg en un cobayo pre-inyectado con vehículo (de vinpocetina) y en la Figura 1b tomada del mismo estudio se ilustra el efecto de la vinpocetina sobre la actividad epileptiforme inducida por 4-AP en el mismo animal después de un tratamiento durante 10 días con vinpocetina (2 mg/kg). Nótese que cuando el animal es tratado con vinpocetina la actividad cortical antes y después de la administración de 4-AP es prácticamente igual.



**Figura 1:** La vinpocetina inhibe los cambios en la actividad cortical por EEG inducidos por 4-AP (Tomado de Sitges y Nekrassov, 2004).

Cabe señalar que en experimentos *in vivo* en cobayos, la vinpocetina inhibe las convulsiones y la actividad cortical epileptiforme inducida por otro agente convulsivo, el pentilentetrazol, incluso al ser utilizada a dosis menores que los antiepilépticos clásicos carbamazepina, fenitoina y valproato (Nekrassov y Sitges, 2006; Nekrassov y Sitges, 2008).

La participación de los canales presinápticos cerebrales de Na<sup>+</sup> en el mecanismo de acción de la vinpocetina y de algunos fármacos antiepilépticos está respaldado por la sensibilidad a dichos fármacos al aumento en la concentración interna de Na<sup>+</sup> inducida por despolarización, en terminales nerviosas cerebrales aisladas (Sitges *et al.*, 2005; Sitges *et al.*, 2006). Varios estudios han demostrado que a nivel presináptico cerebral, la vinpocetina inhibe el aumento en la concentración interna de los iones Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> inducido por despolarización (Tretter y Adam-Vizi, 1998; Sitges y Nekrassov 1999; Sitges *et al.*, 2005; Sitges *et al.* 2006).

Es importante señalar que en pacientes no se han observado efectos secundarios adversos graves o contraindicaciones de la vinpocetina, al ser utilizada a dosis terapéuticas (Subhan y Hindmarch, 1985; Balestreri *et al.*, 1987; Kemény *et al.*, 2005), por lo que en conjunto estas observaciones convierten a la vinpocetina en una opción prometedora para el tratamiento farmacológico de la epilepsia y otras alteraciones neurológicas.

## **I.4. Estrategias experimentales para el estudio de las convulsiones**

Con el propósito de estudiar las condiciones existentes durante las crisis epilépticas, la primera aproximación de los investigadores fue el desarrollo de diversas metodologías en animales, tanto electrofisiológicas como farmacológicas, para inducir convulsiones y actividad cerebral epileptiforme que asemejan los eventos que se presentan en pacientes humanos con diferentes tipos de epilepsia. Löscher (1998) describió los criterios que debe cumplir un modelo experimental ideal para inducir convulsiones:

- 1) Desarrollo de convulsiones de forma espontánea y recurrente.
- 2) Convulsiones con fenómenos clínicos observables similares a los que ocurren en la epilepsia humana.
- 3) Desarrollo progresivo de epilepsia con la edad que asemeje a los síndromes epilépticos generalizados en el ser humano.
- 4) La ocurrencia de las crisis debe estar asociada con la generación de actividad cerebral excesiva en el EEG.
- 5) Al administrar conjuntamente fármacos antiepilépticos, su farmacocinética debe ser igual que en el ser humano, lo cual permite el mantenimiento de niveles efectivos de fármaco durante tratamientos crónicos.
- 6) Las concentraciones efectivas de fármacos antiepilépticos administrados debe ser cercana a la requerida para el control de las convulsiones en el ser humano.

Actualmente no se conoce ningún modelo experimental que cumpla con todas estas características. La mejor opción es seleccionar algún modelo que reúna el mayor número posible de las mismas, eficiente y con resultados reproducibles. Los modelos animales más utilizados para inducir convulsiones se enlistan en la siguiente tabla (revisada detalladamente por Engel, 1992):

**Tabla 3: Clasificación de modelos para inducir convulsiones de acuerdo al tipo de convulsión inducida** (Modificado de Engel, 1992).

**Convulsiones parciales**

- Estimulación eléctrica
- Agentes convulsivantes
  - Bloqueadores de inhibición (Ej: Antagonistas de GABA<sub>A</sub>)
  - Incrementadores de la excitación (Ej: Agonistas de glutamato)

**Convulsiones generalizadas**

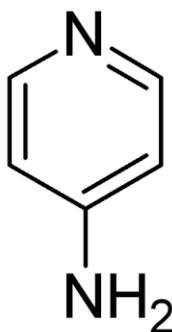
- Tipo convulsivo
- Electroshock máximo (MES)
- Agentes convulsivantes administrados sistémicamente (Ej: Pentilentetrazol, **aminopiridinas**, pilocarpina, bicuculina, kainato, ouabaina, acetilcolinesterasas, flurotil)
- Crisis de ausencia
- Estimulación eléctrica subcortical
- Penicilina
- $\gamma$ -hidroxibutirato (GHB)
- Hipertermia

Otra estrategia ampliamente utilizada es la técnica de encendido (“*kindling*”, en inglés), un modelo *in vivo* de epilepsia desarrollado por Goddard *et al.* (1969) que consiste en la aplicación repetida de una estimulación cerebral (eléctrica o química) inicialmente subconvulsiva, a la cual progresivamente aumenta la sensibilidad del individuo hasta producir actividad epiléptica y convulsiones de forma espontánea.

Los estudios tanto *in vivo* como *in vitro* para desarrollar e investigar los efectos de los fármacos antiepilépticos han sido realizados en su mayoría con modelos experimentales capaces de inducir químicamente convulsiones, es decir, la administración de agentes convulsivos como el pentilentetrazol y la 4-aminopiridina. En la presente investigación, el modelo experimental utilizado para el estudio de los eventos presinápticos que asemejan los que ocurren durante las crisis epilépticas, fue el agente convulsivo 4-aminopiridina.

## I.5. 4-Aminopiridina (4-AP)

La actividad epileptiforme que induce la 4-aminopiridina (4-AP), cuya estructura se muestra en la **Figura 2**, está ampliamente documentada. Por ejemplo, en rebanadas de hipocampo de rata perfundidas con 4-AP este agente induce rápidamente sincronización de la actividad neuronal (Ives y Jefferys, 1990), actividad epileptiforme (Psarropoulou y Avoli, 1996; Armand *et al.*, 1999) y la generación de potenciales postsinápticos excitadores, asociados con la generación de potenciales de acción repetitivos (Perreault y Avoli, 1991). Por otra parte, *in vivo* la 4-AP induce convulsiones tipo tónico-clónicas, en ratones inyectados parenteralmente (Yamaguchi y Rogawski, 1992), y un aumento en la actividad cerebral cortical, observado por EEG en cobayos (Nekrassov y Sitges, 2003).



**Figura 2:** Estructura de la 4-aminopiridina

Anteriormente se demostró que la 4-AP facilita la liberación de neurotransmisores tanto excitadores como inhibidores en terminales nerviosas aisladas cerebrales precargadas con neurotransmisores marcados radiactivamente (Tapia y Sitges, 1982), e *in vivo* induce la liberación de glutamato (Morales-Villagrán y Tapia, 1996). Este hallazgo

se corroboró años después al observarse un aumento en la liberación de glutamato endógeno en terminales nerviosas aisladas cerebrocorticales mediante el uso de fluorimetría continua (Tibbs *et al.*, 1989).

La acción de la 4-AP a nivel presináptico también ha sido ampliamente investigada. A pesar de que en un principio la determinación de la concentración interna de iones en terminales nerviosas aisladas mediante el uso de isótopos radioactivos (como  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ) fue complicada dada la limitada sensibilidad de esta metodología (Tapia *et al.*, 1985), mediante el uso de indicadores fluorescentes selectivos y altamente sensibles fue posible demostrar que la 4-AP modifica la concentración interna de los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ , principales responsables de la despolarización membranal frente a un potencial de acción y de la excitabilidad neuronal. Con el indicador selectivo para  $\text{Ca}^{2+}$  fura-2 en terminales nerviosas aisladas cerebrales, fue posible determinar que la 4-AP aumenta la concentración interna de  $\text{Ca}^{2+}$  (Tibbs *et al.*, 1989; Heemskerk *et al.*, 1991; Galván y Sitges, 2004; Sitges *et al.*, 2005). En la misma preparación, la 4-AP aumenta la concentración interna de  $\text{Na}^+$  y disminuye la concentración interna de  $\text{K}^+$ , determinado por cambios en la fluorescencia de los indicadores SBFI y PBFI, selectivos para los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , respectivamente (Galván y Sitges, 2004).

El bloqueo producido por la 4-AP de canales de  $\text{K}^+$ , particularmente los canales sensibles a voltaje de tipo transitorio (Tipo-A) y sostenido, ha sido identificado a partir del bloqueo de corrientes de  $\text{K}^+$  en estudios electrofisiológicos en diversos modelos neuronales (Yeh *et al.*, 1976; Gustafsson *et al.*, 1982; Zona *et al.*, 1988). Este evento podría tener como consecuencia una inhibición de la actividad de la ATP-asa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , encargada de restaurar el gradiente de estos dos iones posterior a la despolarización, por lo cual al disminuir su actividad se esperaría un aumento en la concentración interna de

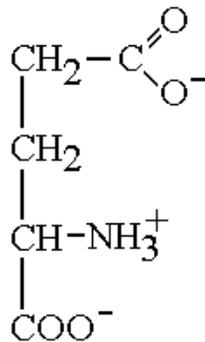
Na<sup>+</sup> y una disminución de la concentración de K<sup>+</sup> dentro de las terminales nerviosas. La disminución en la concentración interna de K<sup>+</sup> (estudiada por cambios en la fluorescencia de PBFI) observada en terminales nerviosas aisladas de estriado (Galván y Sitges, 2004) sugiere, por lo tanto, que el bloqueo de canales de K<sup>+</sup> ocurre en esta preparación.

Sin embargo, ha sido demostrado que la apertura de los canales de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> sensibles a voltaje por la 4-AP es un evento independiente al bloqueo de los canales presinápticos de K<sup>+</sup> o a la inhibición de la actividad de la ATP-asa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. En terminales nerviosas aisladas de estriado, la inhibición directa de la actividad de la ATP-asa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> con ouabaina produce un aumento progresivo de la concentración interna de Na<sup>+</sup> que además sólo es ligeramente sensible al bloqueador de canales de Na<sup>+</sup> sensibles a voltaje, tetrodotoxina. En contraste, el aumento de la concentración interna de Na<sup>+</sup> que induce la 4-AP es repentino y altamente sensible a tetrodotoxina, lo cual sugiere un efecto directo de la 4-AP sobre los canales de Na<sup>+</sup> que permite su apertura (Galván y Sigtes, 2005).

A diferencia de otras estrategias utilizadas in vitro para despolarizar las terminales nerviosas aisladas, la 4-AP provoca una despolarización transitoria de la membrana en terminales nerviosas aisladas que contrasta con la despolarización sostenida inducida por agentes como la veratridina y una alta concentración de K<sup>+</sup> (Tibbs *et al.*, 1989). Por estos motivos, la 4-aminopiridina representa una mejor aproximación al estudio de los eventos presinápticos que ocurren durante las crisis epilépticas.

## I.6. Glutamato

El ácido glutámico (ácido 2-aminopentanodioico) es un aminoácido no esencial que pertenece al grupo de los aminoácidos ácidos. Es una molécula que desempeña múltiples funciones en el cuerpo humano. En condiciones fisiológicas, ambos grupos carboxilos del ácido glutámico se encuentran ionizados, por lo que la molécula se presenta mayoritariamente en su forma **glutamato**, con una carga neta negativa (**Figura 3**).



**Figura 3:** Glutamato

En el cerebro el glutamato ha sido identificado como el neurotransmisor excitador más importante y más abundante. Inicialmente se demostró por inmunohistoquímica que en la mayor parte de las estructuras cerebrales se expresan transportadores de glutamato, localizados específicamente en las membranas plasmática y vesicular de las neuronas (revisado por Fonnum, 1984), y que el contenido total de glutamato en el cerebro completo de rata es más de tres veces mayor que el de cualquier otro aminoácido (McGeer y McGeer, 1989). Posteriormente Sitges *et al.* (2000) determinaron por HPLC la concentración endógena de glutamato, aspartato, GABA y dopamina en terminales nerviosas aisladas de estriado en condiciones de reposo y encontraron que la

concentración de glutamato es más de 2 veces mayor que la de cualquiera de los otros neurotransmisores cuantificados en dicho estudio.

En las terminales nerviosas el glutamato se encuentra principalmente dentro de vesículas (Shigeri *et al.*, 2004). La liberación de neurotransmisores por exocitosis se inicia con la llegada de un potencial de acción a las terminales nerviosas. La despolarización de la terminal nerviosa produce una apertura repentina y transitoria de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje, provocando a continuación, entre otros eventos, la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje. Dada la gran diferencia entre las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  fuera y dentro de la terminal ( $\text{Ca}_o \gg \text{Ca}_i$ ), la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta rápidamente la concentración interna de  $\text{Ca}^{2+}$  en las terminales nerviosas. Este evento es identificado por proteínas integrales en las membranas vesiculares, cuyo resultado es la facilitación de la fusión de las vesículas sinápticas (que contienen glutamato) con la membrana plasmática, liberando así el neurotransmisor al espacio sináptico. En las terminales nerviosas cerebrales la liberación de glutamato mediante exocitosis ha demostrado ser dependiente de ATP y de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular (Sanchez-Prieto *et al.*, 1987).

En condiciones fisiológicas la función de los transportadores neuronales y gliales de glutamato en la membrana plasmática es remover a este neurotransmisor del espacio sináptico, aunque el transportador funciona cerca de su equilibrio termodinámico. Por esta razón, una despolarización persistente de la membrana presináptica, que puede ocurrir por el aumento en la concentración interna de  $\text{Na}^+$ , puede provocar la liberación del glutamato directamente desde el citoplasma por reversión de sus transportadores, de forma independiente al  $\text{Ca}^{2+}$  y al ATP (Atwell *et al.*, 1993). Esta liberación de glutamato no contribuye de manera significativa durante la despolarización breve requerida para

inducir la excitotoxicidad. Sin embargo, algunas patologías como la isquemia o la anoxia, donde los niveles de ATP disminuyen lo suficiente para inhibir la liberación por excitotoxicidad y la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , provocan un aumento en la concentración interna de  $\text{Na}^+$  y con ello una mayor contribución de la liberación citoplásmica de glutamato (Kauppinen *et al.*, 1988; McMahon y Nicholls, 1991).

Las evidencias farmacológicas *in vivo* e *in vitro* ha relacionado a las terminales nerviosas liberadoras de glutamato y GABA con la ocurrencia de crisis epilépticas. Por ejemplo, en rebanadas de hipocampo de animales con epilepsia inducida por la técnica de encendido se encontró un aumento importante de la función neuronal excitadora mediada exclusivamente por la activación de receptores de glutamato (Kohr *et al.*, 1994). De forma similar, en el modelo convulsivo de pilocarpina se ha observado una disminución de la transmisión sináptica inhibitoria mediada por los receptores  $\text{GABA}_A$ . Diversos estudios como los anteriores han conducido a la hipótesis de que la hiperexcitabilidad que se presenta en el tejido epiléptico puede ser consecuencia de un aumento en la función de las terminales nerviosas responsables de la actividad neuronal excitadora (como las glutamatérgicas), o bien, de una disminución en la capacidad inhibitoria de las terminales nerviosas mediada por GABA (Gibbs y McNamara., 2006).

## II. CONCEPTOS

### II.1. Distribuciones iónicas en las Células Excitables

Las propiedades bioeléctricas de las neuronas resultan de la existencia de una diferencia de potencial electroquímico transmembranal. El potencial transmembranal o potencial de la membrana de una neurona o de alguna de sus partes, incluyendo a las terminales nerviosas, está determinado por las distribuciones y las permeabilidades relativas a los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  principalmente.

En condiciones de reposo, el citoplasma de la neurona o de la terminal nerviosa presináptica presenta una elevada concentración de  $\text{K}^+$  y una baja concentración de  $\text{Na}^+$  comparativamente con el fluido extracelular, en donde el  $\text{K}^+$  no excede el 5% de la concentración citoplásmica y el  $\text{Na}^+$  supera alrededor de 10 veces la concentración citoplásmica. En la **Tabla 4** se indican las concentraciones internas y externas de los iones principalmente involucrados en el potencial de membrana.

La permeabilidad de la membrana en condiciones de reposo es alta para el  $\text{K}^+$  y baja para el  $\text{Na}^+$ . En las membranas de las terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) en reposo hay un exceso de cargas negativas en la parte interna de la membrana y un exceso de cargas positivas en su parte externa. La membrana del sinaptosoma (como las de otras membranas excitables) tiene la capacidad de mantener esta separación de cargas pues actúa como una barrera semipermeable a la difusión de los iones antes mencionados. Esta separación de cargas determina el potencial de reposo de la membrana, el cual es negativo en el interior con respecto al exterior.

**Tabla 4: Concentraciones iónicas aproximadas en ambos lados de la membrana plasmática en neuronas**

Fuera	Dentro	Proporción Fuera : Dentro	$E_{ion}$	Permeabilidad en reposo
$[Na^+]_o = 150 \text{ mM}$	$[Na^+]_i = 15 \text{ mM}$	10 : 1	62 mV	Baja
$[Ca^{2+}]_o = 2 \text{ mM}$	$[Ca^{2+}]_i = 200 \text{ nM}$	10 000 : 1	123 mV	Baja
$[K^+]_o = 5 \text{ mM}$	$[K^+]_i = 100 \text{ mM}$	1 : 20	- 80 mV	Alta
$[Cl^-]_o = 150 \text{ mM}$	$[Cl^-]_i = 13 \text{ mM}$	11.5 : 1	- 65 mV	Alta

Las neuronas se comunican entre sí emitiendo señales. Estas señales se producen cuando la distribución iónica o la permeabilidad relativa a los iones que determinan el potencial de la membrana en reposo son perturbadas. La diferencia de potencial de una membrana en reposo puede modificarse en dos sentidos: hiperpolarizándose, cuando el interior se hace aun más negativo con respecto al exterior de la membrana, y despolarizándose, cuando el interior se hace positivo con respecto al exterior.

## II.2. La Preparación Sinaptosomal

A partir de la capacidad de sellado que presentan las membranas biológicas que han sido parcialmente fragmentadas, es posible obtener terminales nerviosas aisladas a partir de homogenados parciales en sacarosa isotónica de una estructura cerebral o del cerebro completo (Gray y Whittaker, 1962). Durante el proceso de homogenización del cerebro o de alguna de sus estructuras previamente diseccionada, la membrana de las terminales nerviosas se rompe en las zonas de mayor adelgazamiento y menor resistencia. Esto permite que las terminales nerviosas se separen de su axón y conserven en su interior sus organelos, al igual que la maquinaria bioquímica necesaria para la síntesis, almacenamiento y liberación de los neurotransmisores (Bradford *et al.*, 1975).

Debido a la fluidez de las membranas celulares y a su capacidad de mantener su continuidad, los fragmentos separados de la membrana de la terminal nerviosa se sellan rápidamente para formar una estructura continua de forma regular, el sinaptosoma o terminal nerviosa aislada. La continuidad de la membrana en los sinaptosomas ha sido evidenciada en preparaciones sinaptosomales vistas al microscopio electrónico (Bradford *et al.*, 1975; Gray y Wittaker, 1962).

Existen evidencias morfológicas y bioquímicas que demuestran que los sinaptosomas recién formados conservan propiedades semejantes a las encontradas en las terminales nerviosas intactas (Bradford *et al.*, 1975). Se ha demostrado extensamente la presencia de un potencial de membrana en los sinaptosomas, gracias al cual éstos son capaces de responder a estímulos eléctricos, como potenciales sinápticos, generando potenciales de acción (Richards y McIlwain, 1967). Los sinaptosomas regulan la entrada y salida de  $\text{Ca}^{2+}$

a través de su membrana y mantienen un nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en el reposo similar al encontrado en las células intactas (Nachshen, 1985). Además, en los sinaptosomas se observa una estrecha relación entre la liberación de neurotransmisores y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la despolarización rápida (Drapeau y Blaustein, 1983).

Bradford (1969) demostró que los sinaptosomas mantenidos a  $37^{\circ}\text{C}$  y en presencia de sustratos adecuados pueden respirar con un consumo constante de  $\text{O}_2$  durante varias horas después de su aislamiento. Por otra parte, Nachsen y Drapeau (1988) demostraron que la membrana plasmática de los sinaptosomas conserva sus características de sensibilidad osmótica y que éstos tienen una gran capacidad amortiguadora para regular el pH citosólico.

En conclusión, puede decirse que la preparación sinaptosomal permite analizar los aspectos químicos del componente presináptico del proceso de la neurotransmisión y que las terminales nerviosas cerebrales aisladas representan un buen modelo para el estudio de la actividad presináptica cerebral al preservar muchas características de las terminales nerviosas intactas como la maquinaria para la captura, almacenamiento y liberación de neurotransmisores y su estrecha relación con el flujo de iones dentro y fuera de la terminal.

### **II.3. Principio del método de detección del neurotransmisor liberado**

Fisiológicamente los neurotransmisores que se liberan desde la neurona presináptica, una vez que llevaron la señal a la célula receptora o neurona postsináptica, son rápidamente eliminados de la hendidura sináptica, para permitir que el potencial de membrana regrese a su nivel de reposo y quede en disposición de recibir otra señal. Existen 3 mecanismos identificados que operan para eliminar a los neurotransmisores de la hendidura sináptica:

- 1) Recaptura del neurotransmisor liberado.
- 2) Difusión del neurotransmisor al espacio extracelular.
- 3) Degradación enzimática del neurotransmisor liberado.

A excepción de la acetilcolina, que cesa su acción al ser degradada por una acetilcolinesterasa específica, los demás neurotransmisores (dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotonina, glutamato, aspartato, GABA, glicina, taurina) cesan mayoritariamente su acción al ser recapturados por las terminales nerviosas que lo liberaron o por células gliales cercanas. Para estos neurotransmisores ha sido demostrada la existencia de sistemas de captura de alta afinidad dependientes de  $\text{Na}^+$  y temperatura.

## **II.4. Utilidad del mecanismo de inactivación por recaptura**

Desde hace varios años, este mecanismo de inactivación ha sido aprovechado por los neuroquímicos para estudiar la liberación de los neurotransmisores ya que es posible incorporar un neurotransmisor marcado radioactivamente en la preparación elegida (sinaptosomas, rebanadas de tejido) para después dar seguimiento a su liberación bajo distintas condiciones experimentales.

Como los sitios de captura de alta afinidad están localizados en las membranas de las terminales nerviosas que normalmente sintetizan, almacenan y liberan a un determinado neurotransmisor, al someter a una preparación heterogénea de sinaptosomas de hipocampo a dicho neurotransmisor marcado radioactivamente se favorece su captura por las terminales nerviosas que normalmente lo liberan. Con base en estas consideraciones, los efectos de varios fármacos antiepilépticos sobre la liberación de glutamato fueron estudiados en terminales nerviosas aisladas de hipocampo de rata, siguiendo el método de detección del neurotransmisor radioactivo.

**III. CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE VARIOS FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS SOBRE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO ESTIMULADA POR 4-AMINOPIRIDINA EN TERMINALES NERVIOSAS AISLADAS DE HIPOCAMPO. COMPARACIÓN CON EL EFECTO DE LA VINPOCETINA.**

### III.1. Introducción

Existe una necesidad clínica no cubierta en el tratamiento de la epilepsia, pues los fármacos antiepilépticos utilizados, a pesar de que controlan las convulsiones, frecuentemente producen efectos secundarios adversos. Además, aproximadamente un tercio de los pacientes epilépticos son refractarios a los mismos. Con el propósito de encontrar nuevas opciones, desde hace varios años en el laboratorio de la Dra. María Sitges se ha investigado a la vinpocetina, un fármaco con potencial antiepiléptico que en experimentos *in vivo* en cobayo inhibe las convulsiones y la actividad cerebral epileptiforme inducidas por los agentes convulsivos, pentilentetrazol y 4-AP, a dosis menores que los fármacos antiepilépticos clásicos: carbamazepina, fenitoina y valproato (Nekrassov y Sitges, 2006; Nekrassov y Sitges, 2008).

Como se mencionó anteriormente, la 4-AP es un agente convulsivo ampliamente utilizado que induce actividad epileptiforme tanto en rebanadas de hipocampo *in vitro* como en el animal *in vivo* (Ives y Jefferys, 1990; Perreault y Avoli, 1991; Yamaguchi y Rogawski, 1992; Psarropoulou y Avoli, 1996; Armand *et al.*, 1999; Nekrassov y Sitges, 2003). La acción de la 4-AP a nivel presináptico también ha sido largamente investigada. En terminales nerviosas aisladas cerebrales, la 4-AP aumenta la concentración interna de  $Ca^{2+}$  (determinado por cambios en la fluorescencia de fura-2; Tibbs *et al.*, 1989; Heemskerk *et al.*, 1991; Galván y Sitges, 2004; Sitges *et al.*, 2005), la concentración interna de  $Na^{+}$  (determinado por los cambios en la fluorescencia de SBFI) y también disminuye la concentración interna de  $K^{+}$  (determinado por los cambios en la fluorescencia de PBFI; Galván y Sitges, 2004).

La participación de los canales presinápticos cerebrales de  $\text{Na}^+$  en el mecanismo de acción de la vinpocetina y de algunos anticonvulsivos está respaldada por la sensibilidad a dichos fármacos del aumento en la concentración interna de  $\text{Na}^+$  inducida por 4-AP, en terminales nerviosas cerebrales aisladas (Ambrósio *et al.*, 2001; Sitges *et al.*, 2005).

Por otro lado, en estudios previos del laboratorio de la Dra. Sitges en terminales nerviosas aisladas de hipocampo se investigó: (1) la sensibilidad de la liberación de glutamato inducida por despolarización con veratridina en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, para determinar la acción selectiva de varios fármacos anticonvulsivos sobre los canales pre-sinápticos de  $\text{Na}^+$  (Sitges *et al.* 2007a); así como (2) la sensibilidad de la liberación de glutamato inducida por despolarización con  $\text{K}^+$  alto en ausencia de  $\text{Na}^+$  externo, para determinar la acción selectiva de los fármacos anticonvulsivos sobre los canales pre-sinápticos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Sitges *et al.* 2007b). La exposición de las terminales nerviosas a la 4-AP, sin embargo, es de esperarse que mimetice mejor los cambios que suceden en el tejido epiléptico, ya que la 4-AP simultáneamente aumenta la permeabilidad de los canales pre-sinápticos de  $\text{Ca}^{2+}$  de manera dependiente de los canales pre-sinápticos de  $\text{Na}^+$  y disminuye la permeabilidad de los canales pre-sinápticos de  $\text{K}^+$  en terminales nerviosas cerebrales aisladas (Galván y Sitges, 2004).

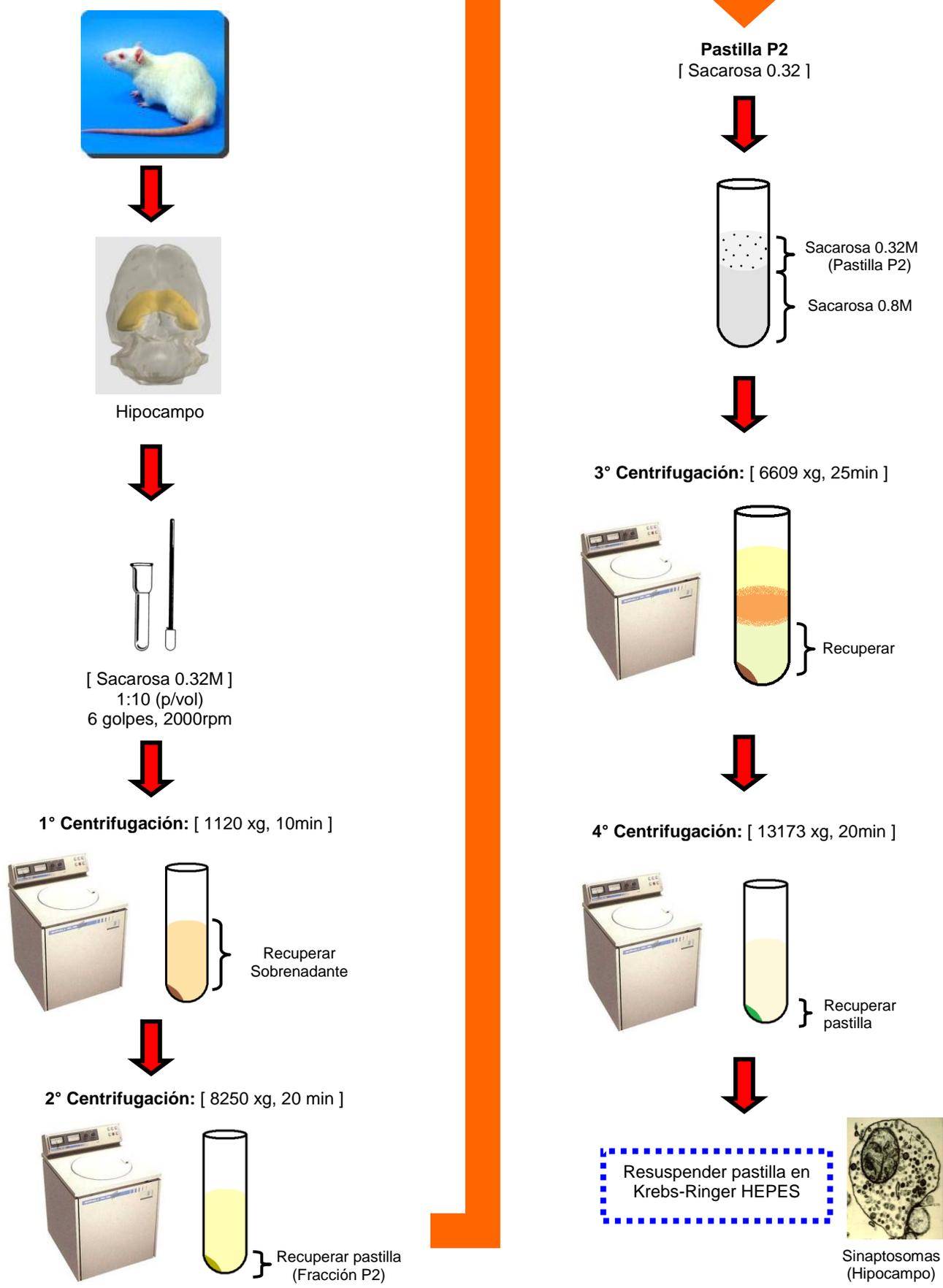
Considerando que la epilepsia experimental puede ser inducida al aumentar la neurotransmisión cerebral excitadora, que el glutamato es el neurotransmisor excitador más importante en el cerebro y la especial susceptibilidad del hipocampo a las crisis epilépticas, en el presente trabajo se investigó el efecto de varios fármacos anticonvulsivos de la primera y segunda generaciones, así como el de la vinpocetina, sobre la liberación de glutamato inducida con el agente convulsivo 4-AP.

## III.2. Metodología

Los hipocampos de cuatro ratas macho de la cepa Wistar (230-280g) fueron diseccionados e inmediatamente colocados dentro de una solución isotónica de sacarosa 0.32mM (1/10: Peso/vol.) a baja temperatura y homogenizados (6 golpes a 2000rpm, 0.15mm de espacio pistilo-vaso).

Las terminales nerviosas aisladas fueron obtenidas mediante una ligera modificación del método descrito por Hájos (1975), para lo cual las suspensiones resultantes de la homogenización de los hipocampos fueron centrifugadas a 1100xg por 10 min y los sobrenadantes obtenidos fueron centrifugados nuevamente por 20 min a 8300xg. Posteriormente la preparación fue sometida a una mayor purificación mediante un gradiente de sacarosa para lo cual la pastilla resultante de la centrifugación anterior se resuspendió en sacarosa 0.32mM y fue adicionada cuidadosamente en un tubo con sacarosa 0.8M. El tubo con el gradiente de sacarosa fue centrifugado durante 25 min a 6609xg, durante los cuales las terminales nerviosas aisladas migran hacia la fracción inferior del gradiente. Esta fracción inferior fue recuperada y centrifugada de nuevo por 20min a 13173xg y la pastilla obtenida fue resuspendida en medio fisiológico. Con este procedimiento se puede obtener una preparación con gran cantidad de terminales nerviosas aisladas y una menor cantidad de otros cuerpos celulares (somas, axones, células gliales) en la misma (**Figura 4**).

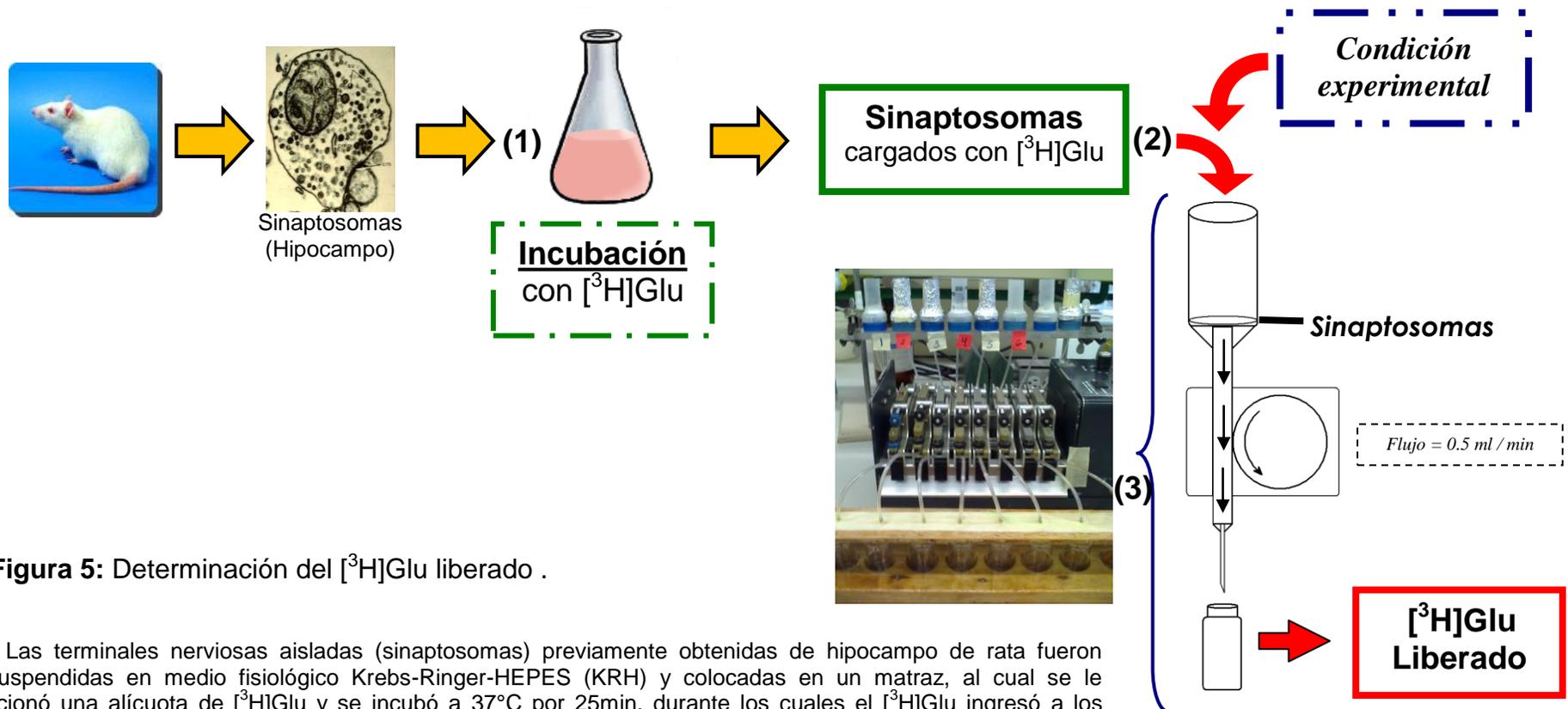
La composición del medio fisiológico Krebs-Ringer-HEPES (KRH) utilizado para resuspender las terminales nerviosas aisladas fue la siguiente (en mM): NaCl 127,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.18, KCl 3.73,  $\text{CaCl}_2$  1.8,  $\text{MgSO}_4$  1.18, HEPES 20, Glucosa 11.2; pH=7.4, oxigenado durante 10 min con  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  (95:5, vol/vol).



**Figura 4:** Aislamiento de las terminales nerviosas.

Para dar seguimiento a la respuesta liberadora de glutamato, las terminales nerviosas aisladas de hipocampo fueron cargadas con el neurotransmisor marcado radiactivamente para estudiar su liberación frente a cada condición experimental (Sitges y Reyes, 1995; Sitges y Galindo, 2005). Cerca de 1.6 mg de terminales nerviosas aisladas fueron resuspendidos en KRH (200µg Prot./mL) e incubados con [<sup>3</sup>H]Glu a la concentración adecuada (1.4µCi, 1.4µM) para favorecer su captura a través de los sistemas de remoción de alta afinidad ubicados en las membranas de las terminales nerviosas, durante 25 min a 37°C. Al terminar la incubación, varias alícuotas (1mL) de terminales nerviosas aisladas precargadas con [<sup>3</sup>H]Glu fueron colocadas en filtros de nitrocelulosa Millipore (0.65µm), dentro de varias cámaras multi-perforadas en paralelo (**Figura 5**).

Después de lavar la radiactividad no incorporada en la preparación con una rápida perfusión de KRH con un flujo rápido (1.3mL/min) durante 8 minutos, el neurotransmisor que se libera es sólo aquel que fue captado por la preparación. La tasa de flujo fue ajustada a 0.5mL/min y el medio perfundido, recolectado en intervalos de 1 min en viales. La dependencia de la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu a los iones Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> fue estudiada en experimentos donde las terminales nerviosas fueron perfundidas en todo momento con medio KRH donde el Na<sup>+</sup> fue sustituido por una cantidad equimolar de N-metil glucamina para el caso de los experimentos de dependencia de Na<sup>+</sup>, o en ausencia de Ca<sup>2+</sup> y adicionando el quelante de Ca<sup>2+</sup> EGTA (100µM) para los experimentos de dependencia de Ca<sup>2+</sup>. Los resultados fueron comparados con un control de medio KRH completo. Para las condiciones experimentales, el KRH contenía además tetrodotoxina (TTX), carbamazepina, fenitoina, oxcarbazepina, lamotrigina, topiramato o vinpocetina, en las concentraciones indicadas en las Figuras 8 a 11. Las terminales nerviosas de hipocampo, bajo las condiciones mencionadas, fueron despolarizadas con 4-AP en las concentraciones indicadas en cada figura.



**Figura 5:** Determinación del  $[^3\text{H}]\text{Glu}$  liberado .

(1) Las terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) previamente obtenidas de hipocampo de rata fueron resuspendidas en medio fisiológico Krebs-Ringer-HEPES (KRH) y colocadas en un matraz, al cual se le adicionó una alícuota de  $[^3\text{H}]\text{Glu}$  y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por 25min, durante los cuales el  $[^3\text{H}]\text{Glu}$  ingresó a los sinaptosomas mediante transportadores en la membrana de las terminales.

(2) Los sinaptosomas cargados con  $[^3\text{H}]\text{Glu}$  fueron colocados en filtros dentro de cámaras multiperforadas conectadas a una bomba de perfusión, que permite la recolección del medio perfundido en viales para la posterior cuantificación de la radiactividad liberada en un contador de centelleo.

Después de perfundir algunos minutos con medio KRH para retirar el  $[^3\text{H}]\text{Glu}$  que no se incorporó a las terminales, el medio perfundido fue recolectado en fracciones cada minuto para determinar la liberación basal de  $[^3\text{H}]\text{Glu}$ . Enseguida, el medio de perfusión fue rápidamente sustituido por uno que contenía además 4-AP. Las fracciones recolectadas a continuación permitieron determinar la liberación de  $[^3\text{H}]\text{Glu}$  inducida por 4-AP. Los valores se expresan en % de  $[^3\text{H}]\text{Glu}$  liberado, de acuerdo al valor obtenido en cada fracción con respecto al  $[^3\text{H}]\text{Glu}$  total en las terminales ( $[^3\text{H}]\text{Glu}$  de todas las fracciones recolectadas +  $[^3\text{H}]\text{Glu}$  en los filtros al final del experimento).

(3) Las múltiples cámaras de la bomba de perfusión permiten probar simultáneamente varias condiciones experimentales. En cada cámara el medio KRH de perfusión contenía un fármaco antiepiléptico, vinpocetina o la condición requerida en cada caso, indicada en la sección de Resultados.



Después de algunos minutos de recolección que sirvieron para determinar la liberación basal de [<sup>3</sup>H]Glu, el medio de perfusión fue rápidamente sustituido por medio KRH con 4-AP y se siguió recolectando durante varios minutos más. Al terminar el tiempo de perfusión, a cada fracción recolectada se le adicionaron 5mL de Tritosol (Fricke, 1975). La radiactividad liberada en cada fracción recolectada y la remanente en los filtros (que contenían a las terminales nerviosas) fue cuantificada usando un contador de centelleo Beckman LS 6500.

Los resultados obtenidos fueron expresados como el porcentaje de [<sup>3</sup>H]Glu liberado cada minuto con respecto al total de [<sup>3</sup>H]Glu capturado por las terminales. La radiactividad total equivale a la radiactividad liberada durante todos los minutos de perfusión en dicha cámara (después del periodo de lavado) más la radiactividad que permaneció en el filtro al final del experimento.

## **Estadística**

Los resultados obtenidos del porcentaje de [<sup>3</sup>H]Glu liberado en cada condición experimental fueron comparados con un control en paralelo utilizando la prueba T de Student (apareada). A partir de  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente significativa la diferencia entre la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu en el medio perfundido inducida por 4-AP en la ausencia o presencia de  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ , TTX o un fármaco anticonvulsivo particular. Sin embargo, en las diferencias estadísticamente significativas encontradas, el valor de P fue mucho menor a 0.05. Las diferencias estadísticas en la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP entre una condición experimental específica y su control se indican en cada Figura.

## Fuente de materiales

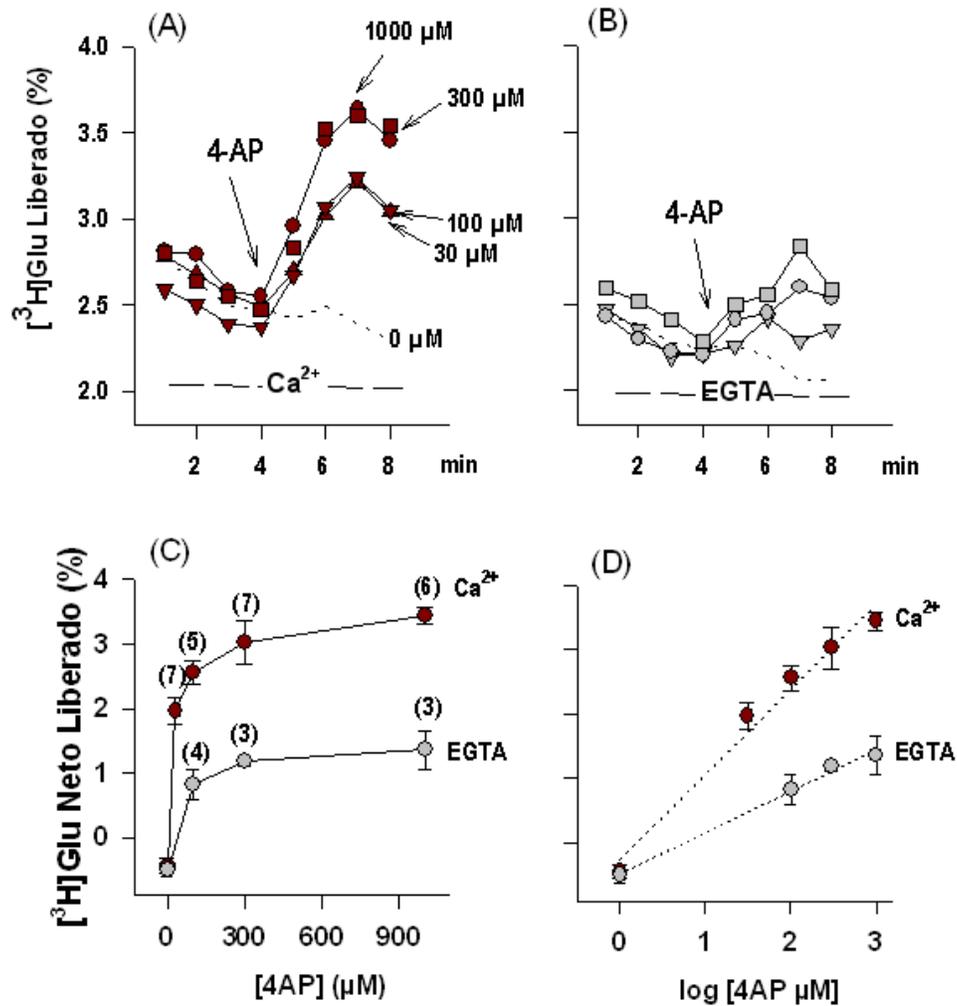
Los fármacos usados en los experimentos fueron adquiridos de las siguientes compañías: La vinpocetina (ácido eburnamenina-14-carboxílico-etil éster) fue obtenida de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) o de Psicofarma S.A. de C.V. (México). El topiramato, la lamotrigina, la TTX y la 4-AP, de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La carbamazepina fue obtenida de ICN Biomedicals Inc. (Ohio) o de Psicofarma S.A. de C.V. (México). La oxcarbazepina y la fenitoina (5,5, difenildantoinuro de sodio), de Psicofarma S.A. de C.V. (México). El ácido L-[3,4-<sup>3</sup>H]glutámico (actividad específica = 51 Ci mmol<sup>-1</sup>) fue adquirido de Pekín Elmer, Life Sciences Inc. (Boston, MA). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

### III.3. Resultados

#### La liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP depende de la presencia de Ca<sup>2+</sup> externo

La **Figura 6A** muestra que cuando las alícuotas de terminales nerviosas purificadas de hipocampo de rata fueron perfundidas con medio KRH con 1mM de Ca<sup>2+</sup> la 4-AP, en las concentraciones crecientes probadas (dentro de un rango de 30-1000 μM), aumentó progresivamente la liberación basal de [<sup>3</sup>H]Glu. La respuesta máxima bajo estas condiciones fue alcanzada con 300μM de 4-AP. Cuando las alícuotas de las terminales nerviosas aisladas fueron perfundidas con medio KRH sin Ca<sup>2+</sup>, la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP 500μM disminuyó notablemente (**Figura 6B**).

En las gráficas de la parte inferior de la **Figura 6** se comparan las respuestas netas de la 4-AP en ausencia y presencia de Ca<sup>2+</sup> en el medio. La respuesta neta se define como el [<sup>3</sup>H]Glu liberado por la 4-AP durante 3 minutos (min 6 a 8 en las gráficas superiores) menos la respectiva liberación basal, estimada mediante la extrapolación de los puntos antes de la adición de la 4-AP usando la cinética de la basal control (línea punteada) de cada experimento particular. La **Figura 6C** muestra las respuestas netas obtenidas con concentraciones crecientes de 4-AP en ausencia y presencia de Ca<sup>2+</sup> en el medio. La **Figura 6D** muestra las mismas respuestas netas en una representación semi-logarítmica.



**Figura 6:** Efecto de concentraciones crecientes de 4-AP sobre el aumento en la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu en presencia y ausencia de Ca<sup>2+</sup> externo, en terminales nerviosas aisladas de hipocampo.

Las terminales nerviosas, precargadas con [<sup>3</sup>H]Glu, fueron perfundidas con medio KRH con (A) o sin (B) Ca<sup>2+</sup>. Al medio sin Ca<sup>2+</sup> se le adicionó el quelante de Ca<sup>2+</sup> EGTA (100 μM). Donde se indica (flecha), el medio de perfusión correspondiente también contenía 4-AP a las siguientes concentraciones: 1000 μM (□), 300 μM (○), 100 μM (▽) o 30 μM (Δ).

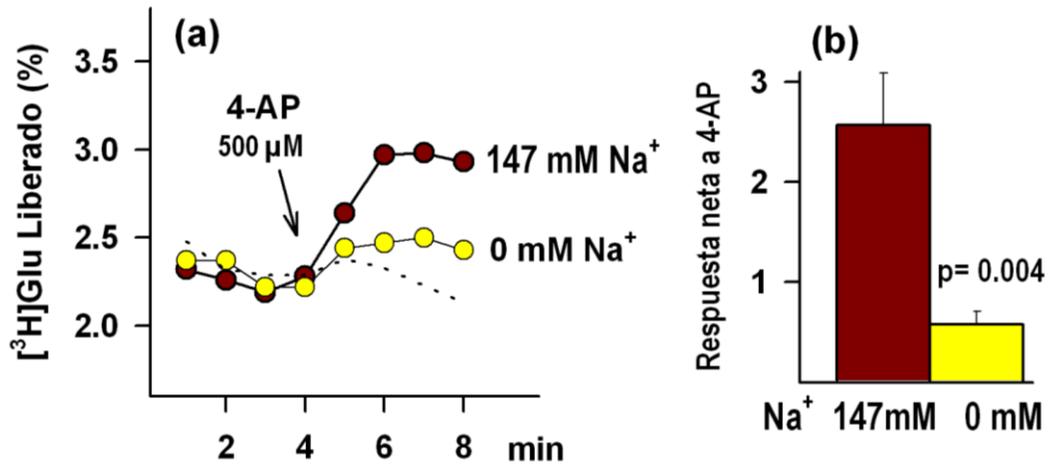
(C) Respuesta neta a la 4-AP (es decir, sobre la basal) en ausencia (círculos grises) y en presencia de Ca<sup>2+</sup> (círculos rojos) en el medio de perfusión. La línea punteada en las Figuras (A) y (B) muestran la cinética de la liberación basal de [<sup>3</sup>H]Glu en ausencia de 4-AP.

(D) Representación semi-logarítmica de la respuesta neta a la 4-AP. Los resultados en C y D son el promedio (± error estándar) del número de experimentos indicado entre paréntesis sobre cada punto, en preparaciones independientes.

## La liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP depende de la presencia de Na<sup>+</sup> externo

El aumento en la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP se redujo notablemente al profundir la preparación con medio KRH sin Na<sup>+</sup>, en experimentos en paralelo. En la **Figura 7a** se muestra un experimento representativo que ilustra el aumento inducido en la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu en ausencia y presencia de Na<sup>+</sup> externo. El promedio de las basales obtenidas por perfusión con medio KRH con y sin Na<sup>+</sup> se muestra en esta Figura como una línea punteada.

Las barras en la **Figura 7b** muestran la respuesta neta a la 4-AP en ausencia y presencia de Na<sup>+</sup> externo. Para calcular estas respuestas netas, las respectivas basales (es decir, en ausencia o presencia de Na<sup>+</sup> externo) fueron restadas de sus respectivas respuestas con 4-AP. En estos y en el resto de experimentos, la 4-AP fue usada a una concentración de 500μM.



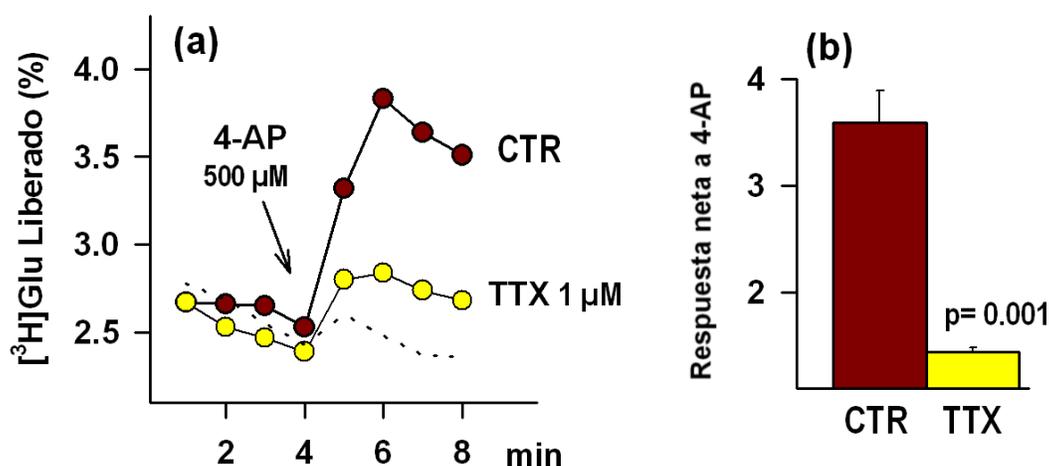
**Figura 7.** Liberación de  $[^3\text{H}]\text{Glu}$  inducida por 4-AP en ausencia y presencia de  $\text{Na}^+$  externo.

**(a)** Las terminales nerviosas aisladas de hipocampo, precargadas con  $[^3\text{H}]\text{Glu}$ , fueron perfundidas con medio KRH con (círculos rojos) o sin  $\text{Na}^+$  (círculos amarillos). Donde se indica (flecha), el medio correspondiente también contenía 4-AP. La liberación basal en esta y el resto de las Figuras es graficada como una línea punteada.

**(b)** Respuesta neta a la 4-AP en presencia (barra roja) o ausencia de  $\text{Na}^+$  (barra amarilla) en el medio de perfusión. La diferencia estadística entre la liberación de  $[^3\text{H}]\text{Glu}$  inducida por 4-AP en ausencia y presencia de  $\text{Na}^+$  está indicada sobre la barra amarilla. Los resultados son el promedio ( $\pm$  error estándar) de los valores obtenidos en 5 experimentos, en preparaciones independientes.

## La liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP es sensible a tetrodotoxina

La **Figura 8** muestra que la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu, dependiente de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> externos, fue también reducida notablemente ( $59 \pm 4\%$ ) por el bloqueo de canales de Na<sup>+</sup> sensibles a voltaje con tetrodotoxina (TTX), usado a una concentración de 1  $\mu$ M. Un experimento representativo que ilustra el aumento en la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu por la 4-AP en la ausencia y presencia de TTX se muestra en la **Figura 8a**. En esta serie de experimentos, la respuesta neta de la 4-AP durante 3 min bajo las condiciones control fue de  $3.6 \pm 4\%$  de la radiactividad total y en presencia de TTX ésta se redujo a  $1.44 \pm 0.04 \%$  de la radiactividad total (**Figura 8b**).



**Figura 8:** Efecto de la tetrodotoxina (TTX) sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por despolarización con 4-AP.

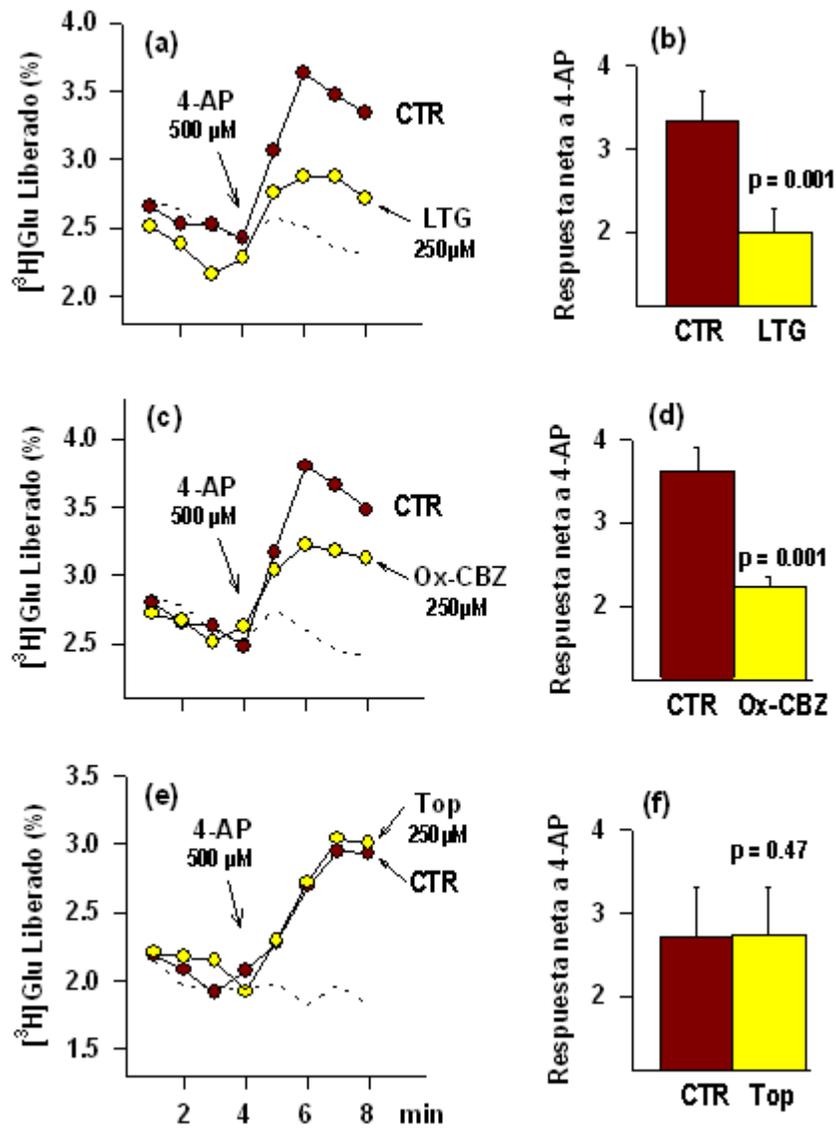
(a) Las terminales nerviosas aisladas de hipocampo fueron perfundidas con medio KRH en la ausencia (círculos rojos) o presencia de 1  $\mu$ M de TTX (círculos amarillos). Donde se indica (flecha), el medio de perfusión también contenía 500  $\mu$ M de 4-AP.

(b) Respuesta neta a la 4-AP en ausencia (barra roja) o presencia de 1  $\mu$ M de TTX (barra amarilla). La diferencia estadística entre la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP en ausencia y presencia de TTX está indicada sobre la barra amarilla. Los resultados son el promedio ( $\pm$  error estándar) de los valores obtenidos en 5 experimentos, en preparaciones independientes.

## Sensibilidad de la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP frente a algunos fármacos antiepilépticos de la segunda generación

La lamotrigina, la oxcarbazepina y el topiramato pertenecen al grupo de los fármacos antiepilépticos de segunda generación. Por primera vez se probaron los efectos de estos fármacos, utilizados a una concentración de 250µM, sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu que induce 500µM de 4-AP.

La **Figura 9a** muestra un experimento representativo de la inhibición causada por 250µM de lamotrigina sobre el incremento en la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP. Las barras en la **Figura 9b** muestran que la liberación neta de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP durante 3 min ( $3.35 \pm 0.36\%$  de la radiactividad total) se redujo en  $40 \pm 5\%$  por acción de la lamotrigina. En presencia de 250µM de oxcarbazepina fue observada una inhibición similar del aumento en la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP 500µM. La **Figura 9c** muestra un experimento representativo de la inhibición causada por este fármaco antiepiléptico. Las barras en la **Figura 9d** muestran que la liberación neta de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP ( $3.62 \pm 0.29\%$  de la radiactividad total) se redujo  $38 \pm 3\%$  en presencia de oxcarbazepina. Las **Figuras 9e** y **9f** muestran que, a una concentración de 250µM, el antiepiléptico topiramato no fue capaz de reducir la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 500µM de 4-AP.



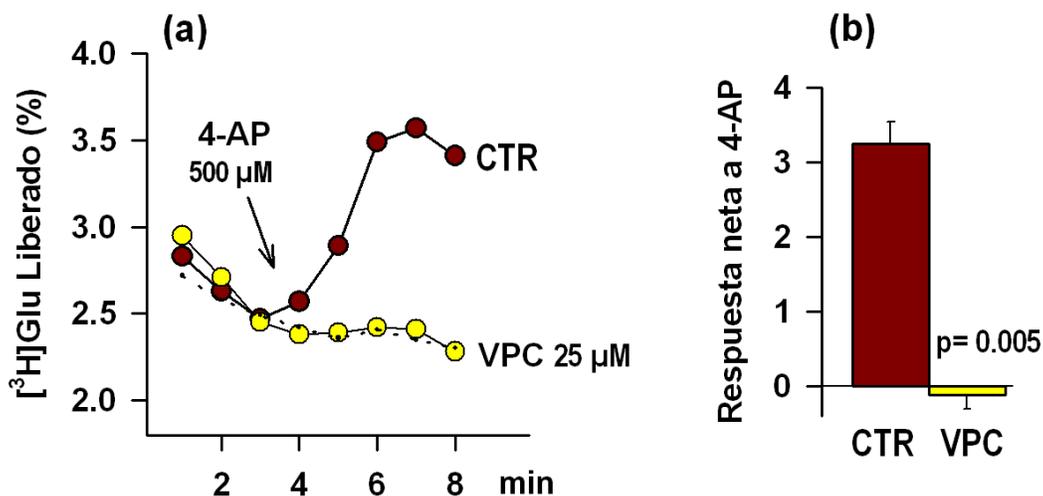
**Figura 9:** Efecto de varios fármacos antiepilépticos de segunda generación sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP.

**Izquierda:** Las terminales nerviosas aisladas de hipocampo fueron perfundidas con medio KRH en ausencia (círculos rojos) o en presencia de 250µM (círculos amarillos) de alguno de los siguientes anticonvulsivos: lamotrigina (LTG), oxcarbazepina (OxCBZ) o topiramato (Top). Donde se indica (flecha), el medio de perfusión también contenía 500µM de 4-AP.

**Derecha:** Respuesta neta a la 4-AP en ausencia (barras rojas) o en presencia de 250µM del anticonvulsivo indicado (barras amarillas). La diferencia estadística entre la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP en ausencia y presencia del anticonvulsivo indicado se encuentra sobre la barra amarilla. Los resultados son el promedio (± error estándar) de los valores obtenidos en 6 (para lamotrigina), 5 (para oxcarbazepina) o 3 (para topiramato) experimentos, en preparaciones independientes.

## La liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP es altamente sensible a la vinpocetina

La **Figura 10** muestra que la vinpocetina, utilizada a una concentración 10 veces menor que los fármacos antiepilépticos mencionados anteriormente, inhibió completamente la liberación del neurotransmisor excitador inducida por 500μM de 4-AP. Un experimento representativo, que ilustra el efecto de 25μM de vinpocetina sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP, se muestra en la **Figura 10a**. Las barras en la **Figura 10b** muestran que la liberación neta de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP durante 3 min ( $3.21 \pm 0.56$  % de la radiactividad total) se previno por completo en presencia de 25μM de vinpocetina.



**Figura 10:** Efecto de la vinpocetina (VPC) sobre el aumento en liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP.

**(a)** Las terminales nerviosas aisladas de hipocampo fueron perfundidas con medio KRH en ausencia (círculos rojos) o en presencia de 25μM de vinpocetina (círculos amarillos). Donde se indica (flecha), el medio de perfusión también contenía 500μM de 4-AP.

**(b)** Respuesta neta a la 4-AP en ausencia (barra roja) o en presencia de 25μM de vinpocetina (barra amarilla). La diferencia estadística entre la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP en ausencia y presencia de vinpocetina se encuentra sobre la barra amarilla. Los resultados son el promedio ( $\pm$  error estándar) de los valores obtenidos en 4 experimentos, en preparaciones independientes.

## **Efectos de dosis-respuesta de la vinpocetina y de varios fármacos antiepilépticos de la primera y segunda generación sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP en terminales nerviosas aisladas de hipocampo**

El efecto de la vinpocetina sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por el agente convulsivo 4-AP también fue probado a dos concentraciones menores (2.5 y 7.5  $\mu$ M) y el efecto de la lamotrigina, la oxcarbazepina y el topiramato, a una concentración menor (75 $\mu$ M) y una mayor (750 $\mu$ M) que la estudiada inicialmente (250 $\mu$ M). Adicionalmente, también fueron investigados los efectos de la carbamazepina y la fenitoina, dos de los fármacos antiepilépticos de primera generación más comunes, en un rango de concentración de 75 a 750 $\mu$ M sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP 500 $\mu$ M.

Se encontró que al igual que la oxcarbazepina y la lamotrigina, estos fármacos de la primera generación también fueron capaces de reducir la respuesta producida por la 4-AP, empleados en el mismo rango de concentraciones. No se incluyen ejemplos de las respuestas desarrolladas de la carbamazepina y la fenitoina frente a la 4-AP en una concentración específica, pero en la **Figura 11** se compara la inhibición de la respuesta neta de la 4-AP 500 $\mu$ M producida por la carbamazepina y la fenitoina, en un rango de concentración de 75-750  $\mu$ M, con respecto a la inhibición de la respuesta neta de la 4-AP causada por la lamotrigina, la oxcarbazepina, el topiramato y la vinpocetina a las concentraciones probadas.

En esta Figura resulta evidente la mayor potencia de la vinpocetina en comparación con los otros fármacos antiepilépticos. Mientras la vinpocetina, utilizada a una concentración de 25µM, impidió completamente la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP (**Figura 11f**), la lamotrigina, la oxcarbazepina, la carbamazepina y la fenitoina únicamente inhibieron la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP en un 25-30 % a una concentración 3 veces mayor (75µM) y cerca del 50% en las dos concentraciones más altas probadas (**Figuras 11a, 11b, 11d y 11e**, respectivamente). El topiramato redujo en 24 ± 6.2% la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP sólo a la concentración más alta probada (**Figura 11c**). Los valores de la respuesta neta de la 4-AP por efecto de cada fármaco se resumen en la **Tabla 5**.

Fármaco	CONCENTRACIÓN		
	75 µM	250 µM	750 µM
Carbamazepina	71 ± 2.3	50 ± 4.0	40 ± 10.4
Fenitoina	75 ± 4.1	65 ± 8.1	50 ± 3.2
Topiramato	110 ± 9.4	101 ± 5.4	76 ± 6.2
Oxcarbazepina	77 ± 17.4	63 ± 3.1	52 ± 8.5
Lamotrigina	70 ± 1.11	61 ± 5.0	52 ± 9.4

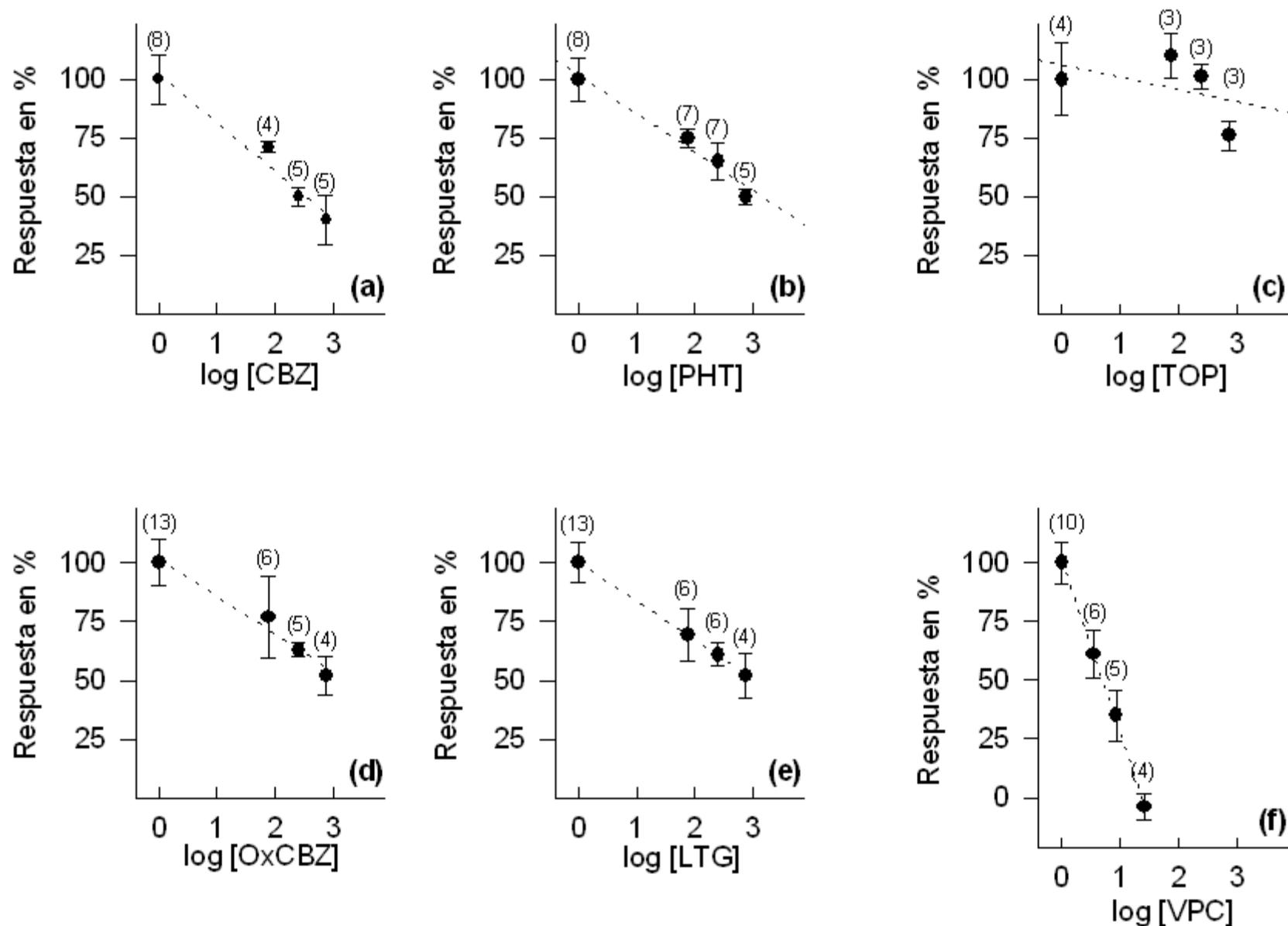
  

Fármaco	2.5 µM	7.5 µM	25 µM
Vinpocetina	61 ± 9.9	35 ± 10.8	-3.9 ± 5.5

**Tabla 5:** Efecto de varios fármacos anticonvulsivos sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP 500µM.

Porcentaje de [<sup>3</sup>H]Glu liberado en cada condición con respecto al control sin fármaco (100%).

Los valores son el promedio ( ± error estándar) de n ≥ 3 experimentos en cada condición.



**Figura 11:** Comparación de la potencia de los fármacos anticonvulsivos probados para inhibir la liberación de  $[^3\text{H}]\text{Glu}$  inducida por 4-AP en sinaptosomas de hipocampo.

Liberación de  $[^3\text{H}]\text{Glu}$  inducida por  $500\mu\text{M}$  de 4-AP en ausencia ( $0\mu\text{M}$ ) o en presencia de concentraciones crecientes de: (a) lamotrigina (LTG), (b) oxcarbazepina (OxCBZ), (c) topiramato (Top), (d) carbamazepina (CBZ), (e) fenitoina (PHT) y (f) vinpocetina (VPC). La "Respuesta en %" se refiere a la respuesta neta ( $[^3\text{H}]\text{Glu}$  liberado durante 3 minutos menos su respectiva basal) en presencia del anticonvulsivo a una concentración específica, expresado con respecto al control (es decir, considerando como 100% a la respuesta neta a la 4-AP sin fármaco, obtenida en paralelo). Los resultados son el promedio ( $\pm$  error estándar) de los valores obtenidos en el número de experimentos indicados entre paréntesis sobre cada punto, en preparaciones independientes.

### III.4. Discusión

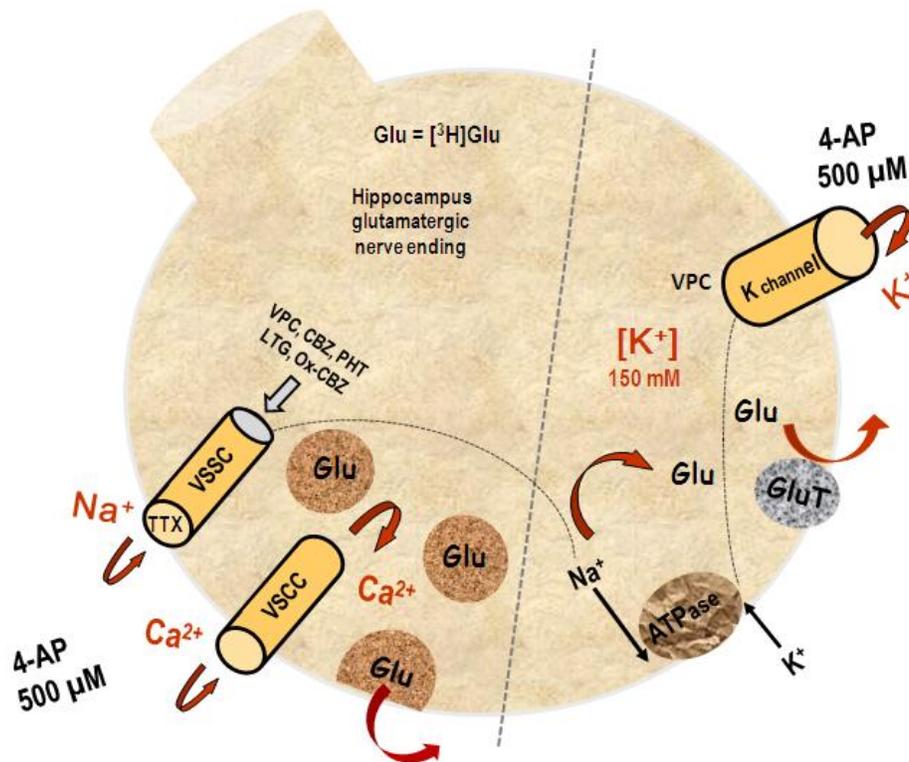
Los canales iónicos neuronales en el cerebro se encuentran entre los blancos más importantes de varios fármacos antiepilépticos, particularmente aquellos canales presinápticos que controlan la liberación de neurotransmisores. Por esta razón, para estudiar de manera selectiva los efectos de los fármacos antiepilépticos sobre los canales presinápticos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , durante los últimos años en el laboratorio se han utilizado estrategias despolarizantes como la veratridina, que permite la entrada de  $\text{Na}^+$  a través de la activación de los canales presinápticos cerebrales de  $\text{Na}^+$  incluso en la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo; o una alta concentración de  $\text{K}^+$ , que incrementa la concentración interna de  $\text{Ca}^{2+}$  por la activación de los canales presinápticos cerebrales de  $\text{Ca}^{2+}$  en ausencia de  $\text{Na}^+$  externo (Sitges y Galindo, 2005; Sitges *et al.*, 2007a, Sitges *et al.*, 2007b). Sin embargo, la despolarización que induce la 4-AP reproduce de manera más cercana la excitación de las terminales nerviosas cerebrales que puede ocurrir durante las crisis epilépticas porque además de aumentar la permeabilidad de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , la 4-AP también bloquea la permeabilidad de los canales de  $\text{K}^+$  en terminales presinápticas cerebrales (Galván y Sitges, 2004). En el presente estudio investigamos por primera vez las dependencias iónicas y los efectos de varios fármacos antiepilépticos sobre la liberación de glutamato inducida por este agente convulsivo en terminales nerviosas aisladas de hipocampo precargadas con el neurotransmisor marcado radiactivamente.

En concordancia con estudios previos del laboratorio realizados en terminales nerviosas cerebrales aisladas precargadas con fura-2 y SBFI, que demostraron que la despolarización con 4-AP aumenta simultáneamente las concentraciones internas de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Galván y Sitges, 2004), en este estudio se encontró que la liberación de [ $^3\text{H}$ ]Glu inducida por 4-AP depende de la presencia de ambos iones en el medio externo, como se ilustra en las Figuras 6 y 7. Esta doble dependencia iónica de la liberación de [ $^3\text{H}$ ]Glu en

las terminales nerviosas cerebrales aisladas, en donde las aproximaciones electrofisiológicas son complicadas dado su reducido tamaño ( $< 0.3 \mu\text{m}$ ), contrasta con la liberación de [ $^3\text{H}$ ]Glu que induce la veratridina o una alta concentración de  $\text{K}^+$ , que son independientes del  $\text{Ca}^{2+}$  externo y del  $\text{Na}^+$  externo, respectivamente (Sitges y Galindo, 2005; Sitges *et al.*, 2007a, Sitges *et al.*, 2007b). Por otra parte, el aumento en la liberación de [ $^3\text{H}$ ]Glu inducida por 4-AP también se acompaña de una disminución en la permeabilidad de los canales de  $\text{K}^+$ , con una consecuente inhibición de la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en la membrana presináptica que dificulta la terminación del potencial de acción. En conjunto, lo anterior sugiere que la liberación de glutamato por respuesta a la 4-AP reproduce de manera más cercana la liberación de este neurotransmisor que ocurre en el tejido epiléptico.

Anteriormente se demostró que el aumento en la concentración interna de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por 4-AP depende de la entrada de  $\text{Na}^+$  vía canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a TTX (Tibbs *et al.*, 1989; Heemskerk *et al.*, 1991; Galván y Sitges, 2004; Sitges *et al.*, 2005). De forma correspondiente, la liberación de [ $^3\text{H}$ ]Glu inducida por 4-AP fue sensible a TTX (Figura 8). Considerando que la fracción de la liberación de neurotransmisores dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  evocada por despolarización se libera por exocitosis, la fracción sensible a TTX de la liberación de [ $^3\text{H}$ ]Glu inducida por 4-AP, que también depende de  $\text{Ca}^{2+}$ , se espera que se libere desde la poza vesicular mediante exocitosis, como se muestra en parte izquierda de la **Figura 12**. Sin embargo la TTX, a una concentración que inhibe completamente el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por la activación directa de los canales presinápticos de  $\text{Na}^+$  (Sitges y Galindo, 2005), sólo inhibió parcialmente la liberación de [ $^3\text{H}$ ]Glu inducida por 4-AP (Figura 8). Por lo tanto, esta fracción de la liberación de [ $^3\text{H}$ ]Glu insensible a TTX inducida por 4-AP posiblemente es liberada desde el citoplasma por reversión del transportador de glutamato, como se ilustra en la parte derecha de la **Figura**

12. La 4-AP, además de aumentar la concentración interna de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  de forma sensible a TTX, también induce la acumulación de  $\text{Na}^+$  de forma insensible a TTX dentro de las terminales nerviosas, acompañada de una disminución de la concentración intracelular de  $\text{K}^+$  como resultado de la inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  encargada de restaurar la concentración interna de este ión (Galván y Sitges, 2004).



**Figura 12:** Representación de los canales presinápticos cuya permeabilidad se compromete por acción de la 4-AP.

El aumento en la permeabilidad de los canales de calcio sensibles a voltaje (VSCC), de los canales de sodio sensible a voltaje (VSSC) y la disminución en la permeabilidad de los canales de  $\text{K}^+$  (IA) causados por el agente convulsivo 4-AP inducen la liberación simultánea de glutamato desde las pozas vesicular y citoplásmica.

El bloqueo de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  que producen los fármacos antiepilépticos carbamazepina, lamotrigina y oxcarbazepina, al igual que la vinpocetina, inhiben la exocitosis de glutamato, la cual también es  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente y sensible a TTX.

El aumento en la corriente IA (por efecto de la vinpocetina) puede prevenir la acumulación de  $\text{Na}^+$ , consecuente del bloqueo de canales de  $\text{K}^+$  por la 4-AP, y la resultante liberación de glutamato por reversión de los transportadores de glutamato (GluT).

Al igual que la TTX, el efecto inhibitor máximo de la lamotrigina, oxcarbazepina, carbamazepina y fenitoina sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP, que aparentemente fue alcanzado con la mayor concentración probada (750µM), no fue mayor del 60% (Figura 11), en contraste con la vinpocetina que causó una completa inhibición de esta respuesta liberadora de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP. Una posible explicación de la mayor eficacia de la vinpocetina para inhibir la liberación de glutamato inducida por 4-AP en terminales nerviosas de hipocampo puede ser que, además de su acción sobre los canales de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>, la vinpocetina contrarresta el bloqueo de la corriente IA producido por la 4-AP, dado que en neuronas de molusco la vinpocetina (30µM), pero no otros fármacos antiepilépticos, aumenta la corriente inactivante rápida de K<sup>+</sup> (IA), sensible a 4-AP (Bukanova *et al.*, 2002). La apertura de los canales presinápticos de K<sup>+</sup> como mecanismo molecular para el desarrollo de nuevos fármacos antiepilépticos es ampliamente reconocida (Wickenden, 2002; Meldrum y Rogawski, 2007) pero sólo hasta años recientes se han comenzado a investigar fármacos anticonvulsivos que actúen sobre dicho blanco molecular (Czuczwar, 2010). Adicionalmente, considerando que la vinpocetina es un inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa tipo 1 (Hagiwara, 1984), es posible que por este medio la vinpocetina pueda regular simultáneamente la actividad de algunos canales iónicos presinápticos. Por otra parte, nuestro hallazgo de que el topiramato, a la dosis más alta probada, únicamente provocó una ligera inhibición en la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP concuerda con estudios previos en neuronas donde las corrientes de Na<sup>+</sup> fueron reducidas sólo parcialmente por topiramato usado a altas dosis (Zona *et al.*, 1997; Mc Lean *et al.*, 2000).

La mayor potencia de la vinpocetina observada con respecto a los fármacos antiepilépticos probados para inhibir la liberación de [<sup>3</sup>H]Glu inducida por 4-AP (Figura 16) posiblemente es extensiva a su acción anticonvulsiva *in vivo*. Por ejemplo, en el cobayo *in vivo*, la vinpocetina inhibe las convulsiones y la actividad cortical epileptiforme inducida

por 4-AP al ser utilizada a una concentración diez veces menor con respecto al fármaco antiepiléptico clásico, carbamazepina (Nekrassov y Sitges, 2008). Anteriormente fue demostrado que la 4-AP aumenta particularmente la liberación de glutamato *in vivo* (Morales-Villagrán y Tapia, 1996) y tomando en cuenta que el glutamato es, por mucho, el neurotransmisor excitador más abundante en terminales nerviosas aisladas (Sitges *et al.*, 2000), la reducción en la liberación de este neurotransmisor por efecto de los fármacos probados bajo condiciones en donde la permeabilidad de los canales iónicos involucrados en su liberación está comprometida (como puede ser la acción de la 4-AP), puede contribuir de manera importante a sus acciones anticonvulsivas.

Por último, considerando que las altas dosis de los fármacos antiepilépticos requeridas para el control de las convulsiones en pacientes epilépticos frecuentemente están acompañadas de efectos secundarios adversos y que la vinpocetina es bien tolerada y sin contraindicaciones en humanos (Hindmarch *et al.*, 1991), la mayor potencia y eficacia de la vinpocetina para inhibir la liberación de glutamato en condiciones de actividad neuronal exacerbada, como ocurre durante una crisis epiléptica, puede ser ventajosa para el tratamiento de la epilepsia. Es importante mencionar que una investigación en curso en pacientes epilépticos refractarios a los fármacos antiepilépticos clásicos, el tratamiento con vinpocetina ha sido efectivo para el control de las crisis epilépticas (resultados no publicados). Adicionalmente, la vinpocetina a bajas dosis ha demostrado mejorar la memoria (Subhan y Hindmarch, 1985; Bhatti y Hindmarch, 1987), en contraste con las altas dosis de los fármacos antiepilépticos requeridas para el control de las convulsiones, que por lo general producen alteraciones en la memoria y cognición (Prevey *et al.*, 1998; Gates, 2000; Kwan y Brodie, 2001; Brunbech y Sabers, 2002; Schmidt, 2002) entre otros efectos secundarios adversos, como la pérdida de la capacidad auditiva, que también es prevenida por la vinpocetina (Sitges y Nekrassov, 2007).

## IV. Referencias

- Ambrósio AF, Silva AP, Malva JO, Soares-da-Silva P, Carvalho AP, Carvalho CM (2001). "Inhibition of glutamate release by BIA 2-093 and BIA 2-024, two novel derivatives of carbamazepine, due to blockade of sodium but not calcium channels". *Biochem. Pharmacol.* 61(10): 1271-1275.
- Armand V, Hoffmann P, Vergnes M, Heinemann U (1999). "Epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in entorhinal cortex hippocampal slices of rats with a genetically determined absence epilepsy (GAERS)". *Brain Res.* 841, pp. 62-69.
- Atwell DA, Barbour B, Szatkowski M (1993). "Nonvesicular release of neurotransmitter". *Neuron* 11: 401-407.
- Balesteri R, Fontana L, Astengo F (1987). "A double-blind placebo controlled evaluation of the safety and efficacy of vinpocetine in the treatment of patients with chronic vascular senile cerebral dysfunction". *J. Am. Geriatr. Soc.* 35: 425-430.
- Bear M, Connors B, Paradiso M (2001). "Neuroscience: Exploring the brain". Lippincott Williams & Wilkins. Estados Unidos, 2001. pp 65.
- Bharucha NE, Shorvon SD (1997). "Epidemiology in Developing Countries", en "Epilepsy: A Comprehensive Textbook" por Engel J y Pedley TA (Editores). Lippincott-Raven Publishers. Estados Unidos, 1997.
- Bhatti JZ, Hindmarch I (1987). "Vinpocetine effects on cognitive impairments produced by flunitrazepam". *Int.Clin.Psychopharmacol.* 2: 325-331.
- Bradford HF (1969). "Respiration in vitro of synaptosomes from mammalian cerebral cortex". *J Neurochem.* 16(5): 675-684.
- Bradford HF, Jones DG, Ward HK, Booher J (1975). "Biochemical and morphological studies of the short and long term survival of isolated nerve-endings". *Brain Res.* 90(2): 245-259.
- Brunbech L, Sabers A (2002). "Effect of antiepileptic drugs on cognitive function in individuals with epilepsy: a comparative review of newer versus older agents". *Drugs.* 62(4): 593-604.
- Bukanova, J, Solntseva, E, Skrebitsky, V (2002). "Selective suppression of the slow-inactivating potassium currents by nootropics in molluscan neurons". *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 5: 229-237.
- Caraveo J, Medina-Mora ME, Rascon ML, Villatoro J, Lopez EK, Juárez F, Gomez M, Martinez NA (1994). "Características psicopatológicas de la población urbana adulta en México. Resultados de una encuesta nacional en hogares". *Anales del Instituto Mexicano de Psiquiatría* 1994: 22-42.

Couldridge L, Kendall S, March A (2001). "A systematic overview - A decade of research: The information and counselling needs of people with epilepsy". *Seizure* 10(8): 605-614.

Czuczwar P, Wojtak A, Cioczek-Czuczwar A, Parada-Turska J, Maciejewski R, Czuczwar SJ (2010). "Retigabine: the newer potential antiepileptic drug". *Pharmacol. Rep.* 62(2): 211-219.

Drapeau P, Blaustein MP (1983). "Initial release of [<sup>3</sup>H]dopamine from rat striatal synaptosomes: correlation with calcium entry". *J Neurosci.* 3(4): 703-713.

Engel J Jr (1992). "Experimental animal models of epilepsy: classification and relevance to human epileptic phenomena". *Epilepsy Res. Suppl.* 8: 9-20.

Engel J Jr, Heinz-Gregor W, Spencer D (1997). "Surgical Therapy", en "Epilepsy: A Comprehensive Textbook" por Engel J, Pedley TA (Editores). Lippincott-Raven Publishers. Estados Unidos, 1997. pp 1673-1675.

Fonnum F (1984). "Glutamate: A neurotransmitter in mammalian brain". *Journal of Neurochemistry* 42(1): 1-11.

Galván E, Sitges M (2004). "Characterization of the participation of sodium channels on the rise in Na<sup>+</sup> induced by 4-aminopyridine (4-AP) in synaptosomes". *Neurochem. Res.* 29(2): 347-355.

Gates, JR (2000). "Side effect profiles and behavioral consequences of antiepileptic medications". *Epilepsy Behav.* 1, 153-159.

Gibbs JW, McNamara JO (2006). "The epilepsies: Phenotype and Mechanisms" en "Basic Neurochemistry" por Siegel GJ, Brady S, Price D (Editores). Elsevier Academic Press. Canadá, 2006. pp 629-638.

Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK (1969). "A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation". *Exp. Neurol.* 25: 295-330.

Gray EG, Whittaker VP (1962). "The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation". *J. Anat.* 96: 79-88.

Gustafsson B, Galvan M, Grafe P, Wigström H (1982). "A transient outward current in a mammalian central neuron blocked by 4-aminopyridine". *Nature* 299: 252-254.

Hagiwara M, Endo T, Hidaka H (1984). "Effects of vinpocetine on cyclic nucleotide metabolism in vascular smooth muscle". *Biochemical Pharmacology* 33(3): 453-457.

Hajós F (1975). "An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity". *Brain Res.* 93(3): 485-489.

Hassel B, Dingledine R (2006). "Glutamate" en "Basic Neurochemistry" por Siegel GJ, Brady S, Price D (Editores). Elsevier Academic Press. Canadá, 2006. pp 629-638.

Hindmarch I, Fuchs HH, Erzigkeit H (1991). "Efficacy and tolerance of vinpocetine in ambulant patients suffering from mild to moderate organic psychosyndromes". *Int. Clin. Psychopharmacol.* 6(1): 31-43.

Heemskerk, FM, Schrama LH, Ghijsen WE, De Graan PN, Lopes da Silva FH, Gispen WH (1991). "Presynaptic mechanism of action of 4-aminopyridine: changes in intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration and its relationship to B-50 (GAP-43) phosphorylation". *J. Neurochem.* 56: 1827-1835.

International League Against Epilepsy (1993). "Guidelines for Epidemiologic Studies on Epilepsy". *Epilepsia*, 34(4):592-596.

Ives AE, Jefferys JG (1990). "Synchronization of epileptiform bursts induced by 4-aminopyridine in the in vitro hippocampal slice preparation". *Neurosci. Lett.* 112(2-3): 239-245.

Kauppinen RA, McMahon HT, Nicholls DG (1988). " $Ca^{2+}$ -dependent and  $Ca^{2+}$ -independent glutamate release, energy status and cytosolic free  $Ca^{2+}$  concentration following metabolic inhibition: possible relevance to hypoglycaemia and anoxia". *Neuroscience* 27: 175-182.

Kemény V, Molnár S, Andrejkovics M, Makai A, Csiba L (2005). "Acute and chronic effects of vinpocetine on cerebral hemodynamics and neuropsychological performance in multi-infarct patients". *J. Clin. Pharmacol.* 45(9): 1048-1054.

King GA (1987). "Protective effects of vinpocetine and structurally related drugs on the lethal consequences of hypoxia in mice". *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 286(2): 299-307.

Kohr G, Mody I (1994). "Kindling increases N-methyl-D-aspartate potency at single N-methyl-D-aspartate channels in dentate gyrus granule cells". *Neuroscience* 62: 975-981.

Kwan P, Brodie MJ (2001). "Neuropsychological effects of epilepsy and antiepileptic drugs". *Lancet* 357(9251): 216-22.

Löscher W (1998). "New visions in the pharmacology of anticonvulsion". *Eur. J. Pharmacol.* 342(1): 1-13.

Lörincz C, Szász, K, Kisfaludy L (1976). "The synthesis of ethyl apovincamate". *Arzneimittelforschung* 26(10a):1907.

Maclean PD (1952). "Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system (visceral brain)". *EGG Clin. Neurophysiol.* 4: 407-418.

McGeer PL, McGeer EG (1989). "Amino Acid Neurotransmitters" en "Basic Neurochemistry" por Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB (Editores). Raven Press. Estados Unidos, 1989. pp 311-332.

Macdonald RL, Meldrum BS. "Principles of antiepileptic drug action", en: "Antiepileptic drugs" por Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS, Penry JK, Dreifuss FE (Editores). Raven Press. Estados Unidos, 1989. pp 59-78.

McLean MJ, Bukhari AA, Wamil AW (2000). "Effects of topiramate on sodium-dependent action-potential firing by mouse spinal cord neurons in cell culture". *Epilepsia* 41: S21-24.

McMahon HT, Nicholls DG (1991). The bioenergetics of neurotransmitter release. *Biochim. Biophys. Acta* 1059: 243-264.

Meldrum BS, Rogawski MA (2007). "Molecular targets for antiepileptic drug development". *Neurotherapeutics* 4(1): 18-61.

Miyamoto M, Murphy TH, Schnaar RL, Coyle JT (1989). "Antioxidants protect against glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250(3): 1132-1140.

Morales-Villagran A, Tapia R (1996). "Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo". *Neurochem.Int.* 28: 35-40.

Nachshen DA (1985). Regulation of cytosolic calcium concentration in presynaptic nerve endings isolated from rat brain. *J. Physiol.* 363: 87-101.

Nachshen DA, Drapeau P (1988). "The regulation of cytosolic pH in isolated presynaptic nerve terminals from rat brain". *J. Gen. Physiol.* 91(2): 289-303.

Nekrassov V, Sitges M, (2003). "Effects of pentylentetrazole and 4-aminopyridine on the auditory brainstem response (ABR) and on the hearing sensitivity in the guinea pig in vivo". *Epilepsy Res.* 53: 245-254.

Nekrassov V, Sitges M (2004). "Vinpocetine inhibits the epileptic cortical activity and auditory alterations induced by pentylentetrazole in the guinea pig in vivo". *Epilepsy Res.* 60(1): 63-71.

Nekrassov V, Sitges M (2006). "Additive effects of antiepileptic drugs and pentylentetrazole on hearing". *Neurosci. Lett.* 406: 276-280.

Nekrassov V, Sitges M (2008). "Comparison of acute, chronic and post-treatment effects of carbamazepine and vinpocetine on hearing loss and seizures induced by 4-aminopyridine". *Clin. Neurophysiol.* 119: 2608-2614.

Nekrassov V, Sitges M (2008). "Comparison of acute, chronic and post-treatment effects of carbamazepine and vinpocetine on hearing loss and seizures induced by 4-aminopyridine". *Clin. Neurophysiol.* 119: 2608-2614.

Perreault P, Avoli M (1991). "Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices". *J. Neurophysiol.* 65(4): 771-785.

Porter RJ, Meldrum BS (1997). "Overview: Antiepileptic Drugs", en "Epilepsy: A Comprehensive Textbook" por Engel J, Pedley TA (Editores). Lippincott-Raven Publishers. Estados Unidos, 1997. pp 1381-1382.

Prevey ML, Delaney RC, Cramer JA, Mattson RH (1998). "Complex partial and secondarily generalized seizure patients: cognitive functioning prior to treatment with antiepileptic medication. VA Epilepsy Cooperative Study 264 Group". *Epilepsy Res.* 30(1): 1-9.

Psarropoulou C, Avoli M (1996). "Developmental features of 4-aminopyridine induced epileptogenesis". *Brain Res. Dev.* 94: 52-59.

Richards CD, McIlwain H (1967). "Electrical responses in brain samples". *Nature* 215(5102): 704-707.

Rogawski MA, Löscher W (2004). "The neurobiology of antiepileptic drugs". *Nat. Rev. Neurosci.* 5(7): 553-564.

Sanchez-Prieto J, Sihra TS, Nicholls DG. Characterization of the exocytotic release of glutamate from guinea-pig cerebral cortical synaptosomes. *J. Neurochem.* 49(1): 58-64.

Sauer D, Rischke R, Beck T, Rossberg C, Mennel HD, Bielenberg GW, Krieglstein J (1988). "Vinpocetine prevents ischemic cell damage in rat hippocampus". *Life Sci.* 43(21): 1733-1739.

Schmidt D (2002). "The clinical impact of new antiepileptic drugs after a decade of use in epilepsy". *Epilepsy Res.* 50: 21-32.

Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K (2004). "Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs". *Brain Res. Brain Res. Rev.* 45(3): 250-265.

Sitges M, Reyes A (1995). "Effects of verapamil on the release of different neurotransmitters". *J. Neurosc. Res.* 40(5): 613-621.

Sitges M, Nekrassov V (1999). "Vinpocetine selectively inhibits neurotransmitter release triggered by sodium channel activation". *Neurochem. Res.* 24(12): 1585-1591.

Sitges M, Nekrassov V, Guarneros A (2000). "Simultaneous action of MK-801 (dizclopine) on dopamine, glutamate, aspartate and GABA release from striatum isolated nerve endings". *Brain Research* 854: 48-56.

Sitges M, Nekrassov V (2004). "Vinpocetine prevents 4-aminopyridine-induced changes in the EEG, the auditory brainstem responses and hearing". *Clin. Neurophysiol.* 115(12): 2711-2717.

Sitges M, Galindo CA (2005). "Omega-agatoxin-TK is a useful tool to study P-type  $Ca^{2+}$  channel-mediated changes in internal  $Ca^{2+}$  and glutamate release in depolarised brain nerve terminals". *Neurochem. Int.* 46(1): 53-60.

Sitges M, Galván E, Nekrassov V (2005). "Vinpocetine blockade of sodium channels inhibits the rise in sodium and calcium induced by 4-aminopyridine in synaptosomes". *Neurochem. Int.* 46(7): 533-540.

Sitges M, Chiu LM, Nekrassov V (2006). "Single and combined effects of carbamazepine and vinpocetine on depolarization-induced changes in  $Na^{+}$ ,  $Ca^{2+}$  and glutamate release in hippocampal isolated nerve endings". *Neurochem. Int.* 49: 55-61.

Sitges M, Nekrassov V (2007). "Acute and chronic effects of carbamazepine, phenytoin, valproate and vinpocetine on BAEP parameters and threshold in the guinea pig". *Clin. Neurophysiol.* 118(2): 420-426.

Sitges M, Chiu LM, Guarneros A, Nekrassov V (2007a). "Effects of carbamazepine, phenytoin, lamotrigine, oxcarbazepine, topiramate and vinpocetine on Na<sup>+</sup> channel-mediated release of [<sup>3</sup>H]glutamate in hippocampal nerve endings". *Neuropharmacology*. 52(2): 598-605.

Sitges M, Guarneros A, Nekrassov V (2007b). "Effects of carbamazepine, phenytoin, valproic acid, oxcarbazepine, lamotrigine, topiramate and vinpocetine on the presynaptic Ca<sup>2+</sup> channel-mediated release of [<sup>3</sup>H]glutamate: comparison with the Na<sup>+</sup> channel-mediated release". *Neuropharmacology* 53(7): 854-862.

Subhan Z, Hindmarch I (1985). "Psychopharmacological effects of vinpocetine in normal healthy volunteers". *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 28(5): 567-571.

Tapia R, Sitges M, Morales E (1985). "Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes". *Brain Res.* 361: 373-382.

Tapia, R., and Sitges, M. 1982. "Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes". *Brain Res.* 250(13): 291-299.

Tibbs GR, Barrie AP, Van Mieghem FJ, McMahon HT, Nicholls DG. 1989. "Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects on cytosolic free Ca<sup>2+</sup> and glutamate release". *J. Neurochem.* 53(6): 1693-1699.

Tretter L, Adam-Vizi V (1998). "The neuroprotective drug vinpocetine prevents veratridine-induced [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise in synaptosomes". *Neuroreport* 9(8): 1849-1853.

Vermeulen J, Aldenkamp AP (1995). "Cognitive side-effects of chronic antiepileptic drug treatment: a review of 25 years of research". *Epilepsy Res.* 22(2): 65-95.

Wickenden AD (2002). "Potassium channels as anti-epileptic drug targets". *Neuropharmacology* 43: 1055-1060.

World Health Organization (2008). "The Global Burden of Disease – 2004 Update". WHO Press. Suiza, 2008. Anexo A.

Yamaguchi S, Rogawski MA (1992). "Effects of anticonvulsant drugs on aminopyridine-induced seizures in mice". *Epilepsy Res.* 11: 9-16.

Yeh JZ, Oxford GS, Wu CH, Narahashi T (1976). "Dynamics of aminopyridine block of potassium channels in squid axon membrane". *J. Gen. Physiol.* 68(5): 519-535.

Zilberter YI (2007). "One reason for increased seizure susceptibility of hippocampus compared with neocortex". *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* 1: 96-98.

Zona C, Pirrone G, Avoli M, Dichter M (1988). "Delayed and fast transient potassium currents in rat neocortical neurons in cell culture". *Neurosci. Lett.* 94(3): 285-290.

Zona, C, Ciotti, MT, Avoli, M (1997). "Topiramate attenuates voltage-gated sodium currents in rat cerebellar granule cells". *Neurosci.Lett.* 231: 123-126.