



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Expresión del cotransportador catión-cloro KCC2 en la sustancia
blanca del foco epiléptico de pacientes pediátricos con epilepsia
refractaria a medicamentos.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

JUÁREZ ZEPEDA TARSILA ELIZABETH



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. LETICIA GRANADOS ROJAS

2016

Ciudad Universitaria, CDMX



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Juárez

Zepeda

Tarsila Elizabeth

58 49 33 37

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

306140257

2. Datos del tutor

Dra.

Leticia

Granados

Rojas

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Pilar

Durán

Hernández

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Liliana

Carmona

Aparicio

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Elvia

Coballase

Urrutia

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

María del Pilar

Torres

García

7. Datos del trabajo escrito.

Expresión del cotransportador catión-cloro KCC2 en la sustancia blanca del foco epiléptico de pacientes pediátricos con epilepsia refractaria a medicamentos.

75 p

2016

Agradecimientos



El presente trabajo de tesis forma parte del protocolo 48/2008 ante el comité de investigación del Instituto Nacional de Pediatría cuyo responsable es la Dra. Leticia Granados Rojas. Se llevó a cabo con el apoyo económico del proyecto 86784 del Fondo Sectorial en Salud del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y de los Fondos Federales del Instituto Nacional de Pediatría (INP) otorgados a la Dra. Leticia Granados Rojas. Se contó con la beca S0008-08-01-86784-01-106 del proyecto 86784 del CONACYT para desarrollar tesis de licenciatura otorgada a la P. de Biología Tarsila Elizabeth Juárez Zepeda.

Al personal adscrito del INP

- Dr. Alfonso Marx Bracho, Jefe del Departamento de Neurocirugía.
- Dra. Matilde Ruiz García, Jefa del Departamento de Neurología.
- Dr. Rodolfo Rafael Rodríguez Jurado, Jefe del Departamento de Anatomía Patológica.
- Dr. Mauricio Rojas Maruri, Adscrito al Departamento de Anatomía Patológica.
- Dr. Marcial Anaya Jara, Adscrito al Departamento de Neurocirugía.
- Dra. Cecilia Ridaura Sanz, Adscrita al Departamento de Anatomía Patológica.
- M. en C. Francisco Javier García Vázquez, Adscrito al Departamento de Anatomía Patológica.
- Histotecnóloga María Luisa Guadarrama Arias, Adscrita al Departamento de Anatomía Patológica.

Personal del quirófano: médicos, enfermeras y técnicos que compartieron su conocimiento. A las facilidades apoyo encontradas en los Laboratorios de Neuromorfometría y Neurociencias del INP.

Al personal adscrito al Instituto de Ciencias Forenses

- Dr. Jaime Cárdenas Camacho, Subdirector Pericial.
- Dr. José Luis Raúl Dorantes Ramírez, Jefe de U. D. de Anfiteatro y Laboratorio de Patología.

A los doctores

- Dr. Mario Antonio Alonso Vanegas, Adscrito al Departamento de Neurocirugía del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

- Dr. Miguel Tapia Rodríguez. Responsable de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.
- Un agradecimiento especial al Dr. José Maldonado de la Compañía Internacional MBF Bioscience, U. S. A.

A los pacientes y sus padres por apoyar al avance de la investigación.

La dedicatoria

de esta tesis

se divide para:

Mamá

Papá

Hermano

Abuela

Tíos

mis amigos

mis doctoras:

Liliana Carmona

Elvia Coballase

Leticia Granados

Noemi Cardenas

que hicieron más

enriquecedora la estancia

en el laboratorio

y todos aquellos

que me apoyaron

directa e indirectamente.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1 Anatomía de la corteza cerebral	3
2.2 Citoarquitectura del cerebro.	5
2.3 Fisiología de la neurona	7
2.3.1 Membrana	7
2.3.2 Potencial de acción	8
2.3.3 Transmisión del potencial	8
2.3.4 Sinapsis	9
2.4 Epilepsia	10
2.4.1 Clasificación	11
2.4.2 Epilepsia Refractaria o de difícil control	13
2.4.3 Cirugía de epilepsia	15
2.4.4 Patologías relacionadas con la epilepsia refractaria	15
2.4.5 Regulación del ácido gama aminobutírico (GABA) y epilepsia	16
2.4.6 GABA	16
2.5 Cotransportadores de cloruro NKCC1 y KCC2	17
2.5.1 NKCC	17
2.5.2 KCC	17
2.6 Estudios de los cotransportadores en el tejido epiléptico	18
3. Justificación	20
4. Hipótesis	20
5. Objetivo general	20
6. Objetivos particulares	20
7. Material y métodos	21
7.1 Anticuerpos	21
7.2 Estandarización de los reactivos para inmunohistoquímica en tejido de rata	21
7.3 Procesamiento del tejido proveniente de humanos	22
7.3.1 Obtención de las muestras	22
7.4 Criterios de inclusión y exclusión	23
7.4.1 Criterios de inclusión de los individuos sometidos a autopsia	23
7.4.2 Criterios de exclusión de los individuos sometidos a autopsia	23
7.4.3 Criterios de inclusión de los pacientes pediátricos con cirugía de epilepsia	23
7.4.4 Criterios de exclusión de los pacientes pediátricos con cirugía de epilepsia	23
7.5 Datos clínicos	24
7.6 Procesamiento de los tejidos	24
7.6.1 Estandarización de la concentración para inmunohistoquímica en tejido cerebral humano.	24
7.6.2 Fijación	24
7.6.3 Selección de cortes para procesar	25
7.6.4 Inmunohistoquímica biotilinaada	25

7.7	Conteo de células	26
7.7.1	Criterios de inclusión de las muestras procesadas	27
7.8	Análisis estadístico	27
8.	Resultados	28
8.1	Manejo clínico del paciente con epilepsia	28
8.2	Datos clínicos de los pacientes con cirugía de epilepsia	28
8.3	Crisis epilépticas	30
8.4	Exámenes de Resonancia Magnética	30
8.5	Exámenes de electroencefalografía (EEG)	36
8.6	Fármacos antiepilépticos	41
8.7	Cirugía	45
8.8	Muestras procesadas para el estudio morfológico	46
8.9	Datos clínicos de los pacientes con estudio morfológico	47
8.10	Datos de las autopsias de individuos en edad pediátrica	48
8.11	Estudio morfométrico	49
8.11.1	Estandarización de los reactivos en tejido cerebral de rata	49
8.11.2	Estandarización de la inmunodetección contra KCC2 en tejido humano	50
8.11.3	Cuantificación de células inmunorreactivas a KCC2 en tejido control y paciente	51
8.11.4	Número de células inmunorreactivas a KCC2 en el grupo con volumen menor a 30 mm ³	56
8.11.5	Número de células inmunorreactivas a KCC2 en el grupo con volumen de 100 mm ³	58
10.	Discusión	60
11.	Conclusiones	69
12.	Referencias	70

Índice de figuras

Figura 1.	División del hemisferio cerebral por lóbulos	4
Figura 2.	Funciones generales de la corteza cerebral	4
Figura 3.	Partes de la neurona	5
Figura 4.	Tipos neuronales	5
Figura 5.	Corteza cerebral	6
Figura. 6	Capas de la sustancia gris y de la sustancia blanca de la corteza cerebral	7
Figura 7.	Clasificación de las crisis, modificada de Berg T. y cols.	14
Figura 8.	Representación de la etapa madura e inmadura de las neuronas	19
Figura 9.	Proceso de perfusión	22
Figura 10.	Técnica inmunohistoquímica biotilinaada contra KCC2 en tejido humano	26

Figura 11. Manejo clínico de los pacientes con epilepsia	29
Figura 12. Porcentajes del tipo de crisis Pre y post quirúrgicas de los pacientes	31
Figura 13. Cirugía de epilepsia	46
Figura 14. Etiología de los 6 casos incluidos en el estudio morfológico	47
Figura 15. Imágenes de la sustancia blanca de autopsia	51
Figura 16. Vista panorámica de las secciones de tejido de un caso de autopsia	52
Figura 17. Malla sobre una sección de tejido	53
Figura 18. Acercamiento a células IR-KCC2	53
Figura 19. Vista panorámica de una sección de tejido de autopsia	54
Figura 20. Vista panorámica de una de las secciones del tejido resecado del foco epiléptico	55
Figura 21. Vista panorámica de un corte del tejido resecado del foco epiléptico	55
Figura 22. Vista panorámica de blanco	56
Figura 23. Promedio y desviación estándar de células IR-KCC2 en sustancia blanca del grupo A	57
Figura 24. Promedio y desviación estándar de células IR-KCC2 en sustancia blanca del grupo B	59

Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación internacional de epilepsia	11
Cuadro 2. Clasificación internacional de los síndromes epilépticos	12
Cuadro 3. Datos generales y diagnóstico de los pacientes	32
Cuadro 4. Descripción y frecuencia de las crisis en los pacientes	34
Cuadro 5. Exámenes de resonancia magnética de los pacientes sometidos a cirugía	37
Cuadro 6. Exámenes electroencefalográficos de los pacientes	39
Cuadro 7. Fármacos antiepilépticos administrados a los pacientes	43
Cuadro 8. Datos generales de la cirugía de epilepsia	45
Cuadro 9. Resumen de los datos clínicos de las muestras de autopsia	49
Cuadro 10. Concentraciones de estandarización de los reactivos en tejido cerebral de rata	49
Cuadro 11. Pruebas de estandarización en tejido de autopsia	50
Cuadro 12. Concentración final de anticuerpos y DAB para el proceso de inmunohistoquímica en tejido humano	50
Cuadro 13. Promedio, desviación estándar y valores de las pruebas estadísticas para el número de células de autopsias y pacientes del grupo A	57
Cuadro 14. Promedio, desviación estándar y valores de las pruebas estadísticas para el número de células de autopsias y pacientes del grupo B	58

Lista de abreviaturas

AB: Anticuerpo	Genero M: Masculino	RMN: Resonancia
AVP: Ácido valproico	HMG: Humanitas	magnética
BDP: Benzodiacepina	Medical Group	RPN: Risperidona
C: Región central	HRK: Lacosamida	SLC12: Siglas en inglés
CBZ: Carbamazepina	I: Hemisferio cerebral	para “Solut Carrier
CD: Región central	Izquierdo	Family 12” (Familia
derecha	IgG: Inmunoglobulina	acarreadora de solutos
CI: Región central	ILAE: Siglas en inglés	12)
izquierda	para “International	SN: Sistema nervioso
CLB: Clobazam	League Against	SNC: Sistema nervioso
CLN: Clonazepan	Epilepsy” (Liga	central
D: Hemisferio cerebral	Internacional Contra	SNP: Sistema nervioso
derecho	la Epilepsia)	periférico
DAB: Diaminobencidina	INCIFO: Instituto de	SPSS V20: Siglas en inglés
DFH: Difenilhidantoina	Ciencias Forenses	para “Statistical
EEG: Electroencefalograma	INP: Instituto Nacional	Package for Social
ETX: Etoxusamida	de Pediatría	Studies versión 20”
F: Frontal	IR-KCC2: Células	(Paquete estadístico
FC: Frontocentral	inmunorreactivas a	para estudios sociales
FD: Frontal derecho	KCC2	versión 20)
FI: Frontal Izquierdo	LVT: Levetiracetam	Sdx: Síndrome
FM: Frontal medio	M: Molar	T: Temporal
FN: Fenitoína	MDZ: Midazolam	TD: Temporal Derecho
FPTI: Frontoparieto-	OXC: Oxcarbacepina	TI: Temporal Izquierdo
temporal Izquierdo	PFA-PB: Paraformaldehido	TOI: Temporo occipital
FTD: Frontotemporal	en buffer de fosfatos	Izquierdo
derecho	PI: Parietal Izquierdo	TPI: Temporo parietal
GABA: Ácido gamma-	PM: Parietal Medio	Izquierdo
aminobutírico	PRM: Primidona	TPM: Topiramato
Genero F: Femenino	Qx: Quirúrgico	

1. Resumen

Introducción

La epilepsia es una afección del sistema nervioso central caracterizada por hiperexcitabilidad neuronal, debida en parte a la desregulación de los cotransportadores catión-cloruro, que regulan la entrada y salida del cloro al espacio intracelular. El KCC2 es un cotransportador que regula la extrusión de cloruro, es una proteína de membrana exclusivo de las neuronas.

En la etapa inmadura y en estados patológicos, existe una menor expresión de este cotransportador en las neuronas, por lo que una alta concentración intracelular de cloruro provoca la despolarización de la membrana generando que el neurotransmisor Acido Gamma aminobutírico (GABA) actué de manera excitadora. Cuando la neurona madura, aumenta la expresión de KCC2 y disminuye la concentración intracelular de cloruro, lo que genera la hiperpolarización de la membrana, que resulta en la acción inhibitoria de GABA.

Objetivo

Cuantificar por métodos estereológicos la expresión del cotransportador KCC2 en la sustancia blanca del foco epiléptico, resecado en la cirugía de epilepsia de pacientes pediátricos refractarios a medicamentos.

Objetivos particulares

- Caracterización clínica de los pacientes sometidos a cirugía de epilepsia.
- Caracterización patológica de los individuos sometidos a autopsia.
- Estandarizar la técnica de inmunodetección contra KCC2 en sustancia blanca del foco epiléptico y de autopsias en edad pediátrica para su cuantificación por medio de estereología.
- Cuantificar el número de células con inmunorreactividad al cotransportador KCC2 en sustancia blanca del foco epiléptico y autopsias en edad pediátrica.

Material y métodos

En este estudio se obtuvieron los datos clínicos y morfométricos de pacientes pediátricos con epilepsia refractaria a medicamentos sometidos a resección del foco epiléptico,

Se cuantificó el número de células inmunorreactivas a KCC2 en base a tres niveles de tinción celular (débil, moderado e intenso) por medio de estereología con el programa Stereo investigator; las muestras se dividieron en dos grupos de acuerdo a su volumen, grupo A (volumen menor a 30 mm³) y grupo B (volumen similar a 100mm³). Las muestras resecadas de pacientes fueron pareadas con tejido de autopsia.

Resultados

El principal hallazgo fue la disminución significativa del número de células inmunorreactivas a KCC2 en la sustancia blanca del foco epiléptico de pacientes con epilepsia de difícil control comparados con las cuantificadas en el tejido de autopsia.

El grupo A mostró una disminución significativa con $p \leq 0.05$ en las tinciones celulares débil e intenso; en las células con tinción moderada de diferencia significativa tuvo una $p \leq 0.01$ mientras que las células totales tuvieron una diferencia muy significativa con una $p \leq 0.001$.

En el grupo B únicamente se encontraron diferencias significativas con $p \leq 0.01$ en la tinción moderada y en las células totales.

Se encontró predominio de la epilepsia sintomática, donde el lóbulo frontal es el más frecuente en las resecciones. El 30% de los pacientes quedo libre de crisis después de la cirugía el 10% no mostró mejoría y el 60% restante mejoro el control de las crisis. Los principales medicamentos antiepilépticos utilizados pre-quirúrgicamente fueron difenilhidantoina (DFH) y levetiracetam, los más utilizados post-quirúrgicamente fueron el levetiracetam y el topiramato.

Conclusiones

La disminución de la expresión del cotransportador KCC2, principal extractor de cloruro, podría contribuir al efecto excitador del neurotransmisor GABA, lo que explicaría en parte el aumento de excitabilidad reportado en el del foco epiléptico reseado en la cirugía de epilepsia.

Actualmente no existe ningún estudio morfométrico de células IR-KCC2 en la sustancia blanca del foco epiléptico de pacientes pediátricos con epilepsia de difícil control, por lo que este estudio representa un avance para futuras investigaciones.

2. Introducción

El sistema nervioso en mamíferos está compuesto por el sistema nervioso periférico (SNP) y por el sistema nervioso central (SNC), capta los estímulos eléctricos y los canaliza a una gran zona altamente organizada de recepción y correlación (SNC) que los interpreta y luego, a su vez, elabora las respuestas adecuadas (SNP), (Lesson y cols., 1990).

El sistema nervioso es una estructura bilateral y esencialmente simétrica con siete partes fundamentales: médula espinal, bulbo raquídeo, protuberancia, cerebelo, mesencéfalo, diencéfalo y los hemisferios cerebrales. En el humano, los hemisferios cerebrales consisten en una capa externa muy plegada, la corteza cerebral y estructuras situadas en la profundidad como los ganglios basales, el hipocampo, hipotálamo, tálamo y los núcleos amigdalinos (Kandel y cols., 2001).

2.1 Anatomía de la corteza cerebral

El cerebro está dividido en dos hemisferios, el hemisferio derecho y el hemisferio izquierdo, estos se dividen a su vez en lóbulos que nombrados de manera coronal de plano anterior a posterior son: frontal, parietal, temporal y occipital, en vista sagital, debajo del lóbulo temporal y frontal se ubica la ínsula; de manera dorsal a ventral se divide en supratentorial e infratentorial, donde el tentorio se considera la división entre el cerebelo y el lóbulo occipital. El lóbulo frontal que abarca la corteza motora primaria, la corteza pre-motora y la corteza suplementaria motora se encarga del movimiento músculo-esquelético, mientras que el área de asociación pre-frontal coordina la información de otras áreas de asociación, controla el comportamiento y habilidades de razonamiento. El lóbulo parietal abarca la corteza primaria somática sensorial y el área de asociación sensorial, es el encargado de recabar la información sensorial de la piel, el sistema músculo-esquelético, gustativo y visceral. Por su parte, el lóbulo temporal procesa los estímulos auditivos con el área de asociación auditiva y la corteza aditiva; el lóbulo temporal en conjunto con

el hipocampo se encargan del aprendizaje, emociones y memoria. La ínsula, conformada por la corteza gustativa y la corteza olfativa se encarga de procesar el gusto y el olfato. Finalmente, el lóbulo occipital registra y procesa los estímulos visuales con la corteza visual y el área de asociación visual (Valadez, 2006; Waxman, 2011) (Figs. 1 y 2).

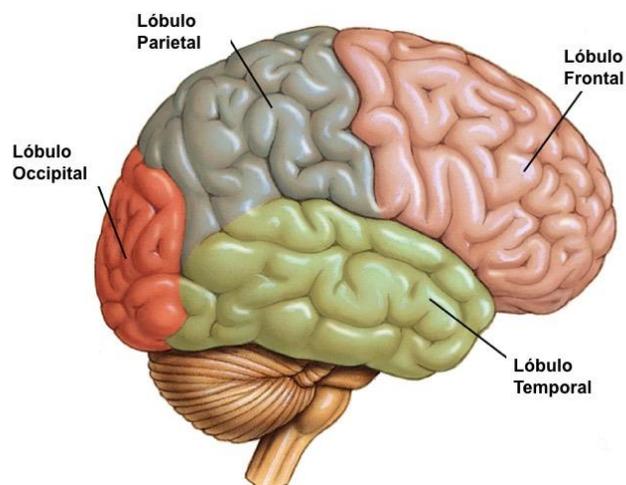


Figura 1. División del hemisferio cerebral por lóbulos vista sagital del hemisferio derecho (Imagen modificada del Departamento de Fisiología, Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica, 2007, Autor del Contenido y Actividades: Dr. Luis Fernando Pacheco B.).

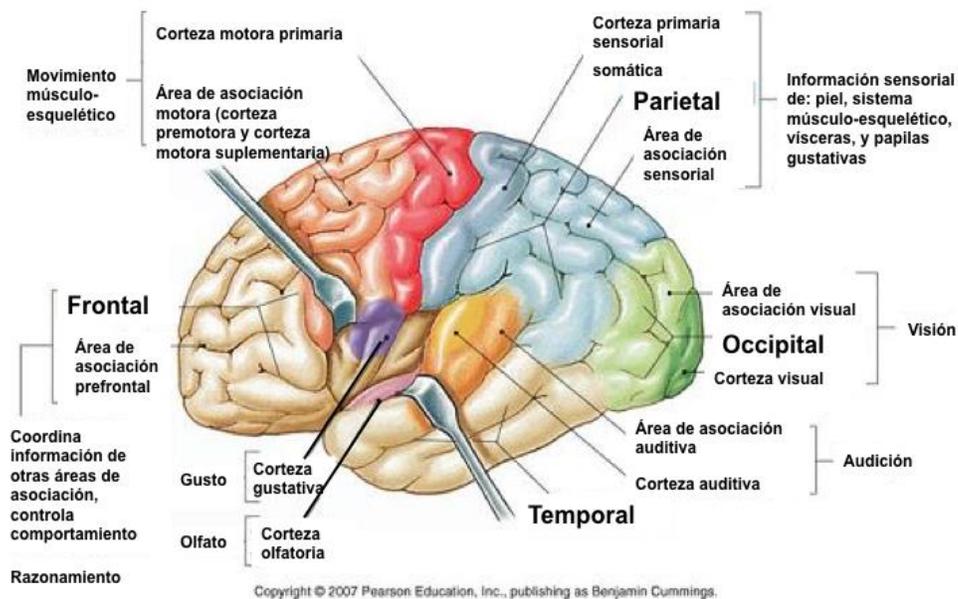


Figura 2. Funciones generales de la corteza cerebral (imagen modificada de Pearson Education, 2007).

2.2 Citoarquitectura del cerebro.

El cerebro es el órgano encargado de procesar las señales recibidas del medio externo e interno, está compuesto principalmente de un conjunto de células neurales: neuronas y glía suspendidas en una matriz lipídica. Una neurona tipo está compuesta por: cuerpo neuronal, dendritas y axón el cuál puede estar aislado del medio por vainas de mielina formadas por las células de Schwann en el SNP y en el SNC por oligodendrocitos; a los espacios entre las vainas de mielina se les conoce como nodos de Ranvier y estas pequeñas regiones no aisladas son las que permiten la transmisión del potencial de acción (Fig. 3).

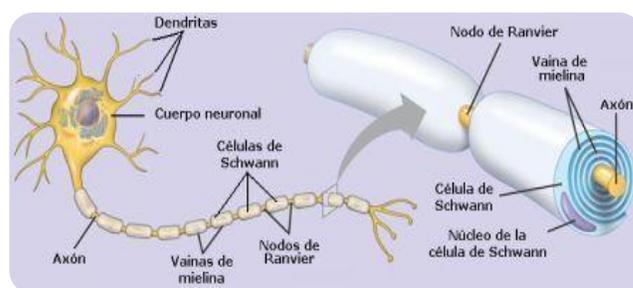


Figura 3. Partes de la neurona tipo del SNP; el cuerpo neuronal contiene al núcleo y organelos, da origen a las dendritas y al axón, el cual está recubierto por vainas de mielina; estas son formadas por las células de Schwann que se encuentran distribuidas a lo largo del axón, el espacio entre las vainas de mielina es conocido como nodo de Ranvier y este espacio es clave para la conducción de los impulsos nerviosos generados por el potencial de acción (Imagen obtenida de Pearson Education, 2007).

A su vez, las neuronas son clasificadas según su morfología y función en:

Sensoriales

- Unipolar
- Bipolar

Integrativas

- Piramidal
- Purkinje
- Interneuronas

Motoras

- Multipolar
- Pseudounipolar

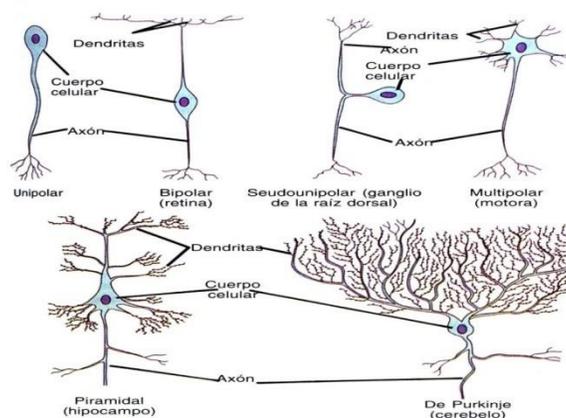


Figura 4. Tipos neuronales, las células unipolares y bipolares cumplen funciones sensoriales; la multipolar y la pseudounipolar son las encargadas de transmitir impulsos motores, y las células de Purkinje y piramidal son las encargadas de integrar la información (imagen de: ¿Qué hay en tu cabeza?).

En el SN existen otros tipos celulares como las células gliales que se encuentran mayor cantidad además de otros tipos celulares de células, a diferencia de las neuronas estas no generan señales eléctricas, a continuación, se resumen el tipo de células en el tejido nervioso por su origen y se da la función de cada una (Valadez, 2002):

De origen ectodérmico:

- Neuroglía
 - Macroglía central
 - Astrocitos: sostén, barrera hematoencefálica.
 - Oligodendrocitos: sostén, vaina de mielina en el SNC.
 - Ependimocitos: revisten cavidades del encéfalo.
 - Macroglía periférica
 - Células de Schwann: vaina de mielina en el SNP.
 - Células capsulares (de los ganglios de la raíz dorsal): encapsulan neuronas separándolas del tejido conectivo que las rodea.

De origen mesenquimatoso:

- Microglía: macrófagos mediadores de respuestas inmunes.
- Células endoteliales de los capilares cerebrales: forma parte de la barrera hematoencefálica.
- Células piales: sostén y nutrición.
- Pericitos vasculares: células contráctiles que se encuentran alrededor del endotelio vascular, en el cerebro ayudan a mantener la barrera hematoencefálica así como funciones homeostáticas del cerebro.

En la corteza cerebral las células neuronales están organizadas por capas que permiten la conducción de los impulsos y neurotransmisores, en el cerebro sano la corteza generalmente está compuesta de seis capas celulares, que incluyen dos capas granulares y dos capas de células piramidales formando la sustancia gris (Fatterpekar y cols., 2002). Debajo de estas capas se encuentra la sustancia blanca integrada principalmente por axones mielinizados y algunas neuronas piramidales (Figs.5 y 6).

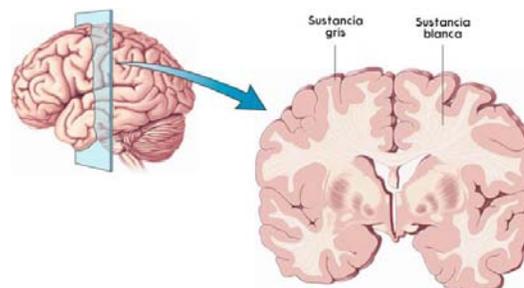


Figura 5. Corte coronal de cerebro humano, mostrando la sustancia gris y la sustancia blanca. (Imagen de Tortora y cols., 2013).

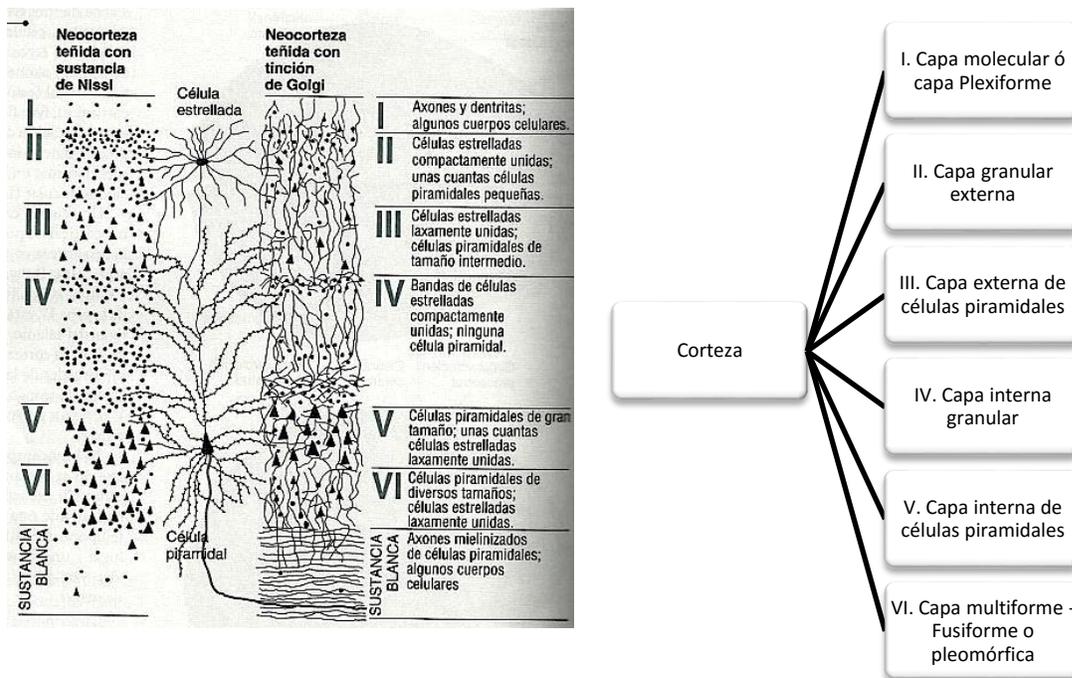


Figura 6. Capas de la sustancia gris y sustancia blanca de la corteza motora cerebral (Imagen de Pinel, 2007).

2.3 Fisiología de la neurona

2.3.1 Membrana

La membrana celular es una estructura que proporciona individualidad a la célula, en la actualidad se considera que la membrana es un mosaico fluido (Singer y Nicolson, 1972) compuesto por:

- Lípidos - Dispuestos en una bicapa con un espesor de 4-5 nanómetros, que se encuentran en estado semifluido, formando la matriz estructural de la membrana, constituida principalmente por fosfolípidos, colesterol y glucolípidos .
- Proteínas – Unidas a las caras internas y externas o bien atravesando la bicapa lipídica; se clasifican según su asociación con la bicapa lipídica en:
 - Periféricas o extrínsecas (unidas de forma débil a la bicapa lipídica).
 - Integrales o intrínsecas (embebidas total o parcialmente en la bicapa lipídica).
 - Transmembranales (que atraviesan la bicapa lipídica).
- Glúcidos – Unidas a proteínas o lípidos de la monocapa externa de la membrana (Tresguerres y cols., 1992).

La membrana celular es una barrera entre el medio interno y externo de la célula, si la neurona se encuentra en reposo, mantiene un estado eléctrico característico que depende de las cantidades de iones que se encuentran en ambos lados de la membrana celular, dicho equilibrio consiste en una diferencia de cargas positivas y negativas; en el interior de la membrana las cargas dominantes son las negativas por los iones cloruro y potasio, mientras el exterior mantiene cargas positivas por las altas concentraciones de sodio. Se denomina potencial de membrana a la diferencia de potencial entre las superficies interna y externa de la membrana.

2.3.2 Potencial de acción

El potencial de acción consiste en un cambio rápido y breve en la polaridad del potencial de membrana (Kandel y cols., 2000). Si una neurona es estimulada con suficiente intensidad para alcanzar el nivel crítico de descarga o umbral, sobreviene el decremento de su potencial de membrana; el potencial de reposo de -70 milivoltios (mv) pasa a +50 mv, provocando una afluencia rápida de sodio y cloruro hacia el citoplasma, invirtiendo la polaridad, lo que genera un potencial de acción (Valadez, 2002).

2.3.3 Transmisión del potencial

La función del potencial de acción es conducir impulsos a grandes distancias, por medio de los axones en milésimas de segundo; este fenómeno es posible ya que la despolarización ocurre por segmentos, generando una reacción en cadena de tal manera que el segmento que se despolariza deja atrás un segmento despolarizado, por esta razón la conducción es unidireccional en los axones. A la propagación del potencial de acción se le conoce como impulso nervioso.

En el momento que un impulso nervioso alcanza la terminal axónica la entrada de sodio y calcio propicia la fusión de las membranas de las vesículas sinápticas con el axolema terminal, abriéndolas

al espacio postsináptico, este proceso libera al neurotransmisor que se liga con un receptor en la membrana postsináptica (Kandel y cols., 2000; Valadez, 2002).

La activación de la membrana post sináptica depende de la cantidad de neurotransmisor, la despolarización de la membrana puede ser graduada en forma de potenciales locales o bien generar un potencial de acción en la siguiente neurona (Valadez, 2002).

2.3.4 Sinapsis

Las regiones terminales de una célula nerviosa (dendritas o axones) contactan con somas o con terminales de otras, los sitios de las membranas que se ponen en relación se especializan, constituyendo las regiones sinápticas.

Por las partes de la neurona que se ponen en contacto pueden ser sinapsis:

- Axo-dendríticas
- Axo-axónicas
- Dendro-somática
- Axo-somáticas
- Dendro-dendríticas

La denominación de estos tipos indica por lo general la dirección del impulso, sin embargo, es frecuente que el contacto de una variedad específica presente reciprocidad a la dirección del impulso. Existen dos tipos de sinapsis según el mecanismo de transmisión, la química y la eléctrica. Funcionalmente las sinapsis pueden ser subdivididas en excitatorias (cuando la neurona postsináptica genera un nuevo estímulo) e inhibitorias (cuando no se genera un nuevo estímulo y además la neurona queda refractaria a nuevos estímulos).

Cuando existe alguna malformación, daño o desequilibrio en el sistema nervioso central se presentan distintas enfermedades como la epilepsia.

2.4 Epilepsia

La epilepsia es un desorden del sistema nervioso central, que se define como:

- “Afección crónica de etiología diversa, caracterizada por la repetición de crisis paroxísticas, debidas a una descarga excesiva de las neuronas corticales, asociadas a diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas” (Gastaut, 1973).

En 2005 la epilepsia fue definida conceptualmente como un desorden cerebral caracterizado por la predisposición a generar crisis epilépticas. Esta definición es aplicada usualmente cuando el paciente tiene dos eventos espontáneos en un periodo menor a 24 hrs. (Fisher y cols., 2014).

Clínicamente la epilepsia es una enfermedad del cerebro definida por cualquiera de las siguientes condiciones (Fisher y cols., 2014):

- a. Al menos dos crisis sin provocación en un lapso menor a 24 horas.
- b. Una crisis no provocada y la probabilidad de más crisis con un riesgo de recurrencia de al menos 60% después de dos crisis no provocadas, que ocurra en los siguientes 10 años.
- c. Diagnóstico de un síndrome epiléptico.

Según estimaciones, se diagnostican anualmente unos 2.4 millones de epilepsia. En los países de altos ingresos, los casos registrados cada año entre la población general oscilan entre 30 y 50 casos por cada 100,000 personas mientras que en los países de ingresos bajos y medianos esa cifra puede ser hasta dos veces más alta (WHO, 2015).

Cincuenta millones de personas de todo el mundo padecen epilepsia, la proporción estimada de la población general con epilepsia activa oscila entre 4 y 10 por cada 1,000 personas, aumentando en los países de ingresos bajos y medianos, de 7 a 14 pacientes por cada 1,000 personas (WHO, 2015). Se

estima que en México del 0.8 al 1.5% de la población padecen esta enfermedad (Ruíz-García y cols., 2002; ILAE., 2015).

2.4.1 Clasificación

La primera clasificación de las manifestaciones clínicas que conforman la epilepsia se publicó en 1960 y se actualizó oficialmente en 1981 y 1989 por la Comisión de Clasificación y Terminología de la Liga Internacional contra la epilepsia (por sus siglas en inglés: ILAE, “International League Against Epilepsy”), (Cuadro 1 y 2).

Cuadro 1. Clasificación Internacional de epilepsia. Tomado de ILAE, 1981

Crisis Parciales

a) *Crisis parciales simples*

Con signos motores

Con síntomas somatosensoriales o sensitivos especiales

Con síntomas o signos autonómicos

Con síntomas psíquicos

b) *Crisis parciales complejas*

Con inicio parcial simple seguido de pérdida de la conciencia

Con pérdida de la conciencia desde el inicio

c) *Crisis parciales secundariamente generalizadas*

Crisis parciales simples secundariamente generalizadas

Crisis parciales simples secundariamente complejas

Crisis parciales simples secundariamente complejas y secundariamente generalizadas

Crisis Generalizadas

a) *Crisis de ausencia*

Ausencias típicas

Ausencias atípicas

b) *Crisis mioclónicas*

c) *Crisis clónicas*

d) *Crisis tónico-clónicas*

e) *Crisis atónicas*

Crisis epilépticas no clasificadas

1. Epilepsias Localizadas (focales)

1.1 Idiopáticas

Epilepsia benigna de la infancia con puntas centrotemporales

Epilepsia de la Infancia con paroxismos occipitales

1.2 Sintomáticas

Epilepsia parcial continua progresiva de la infancia (Síndrome de Kojewnikow)

Síndromes caracterizados por crisis con modos específicos de precipitación

Epilepsias del lóbulo temporal, frontal, parietal y occipital

1.3 Criptogénicas

2. Epilepsias o Síndromes Generalizados

2.1 Idiopáticos

Convulsiones Neonatales Benignas Familiares

Convulsiones Neonatales Benignas

Epilepsia Mioclónica Benigna de la Infancia

Ausencia Infantil y Juvenil

Epilepsia con Crisis de Gran Mal al Despertar

Epilepsias con crisis precipitadas por modos de activación específicos

2.2 Criptogénicos

Síndrome de West o Espasmos Infantiles

Síndrome de Lennox – Gastaut

Epilepsia con crisis mioclónicas-astáticas

Epilepsia con ausencias mioclónicas

2.3 Sintomáticos

Encefalopatía Mioclónica Temprana

Encefalopatía Infantil Temprana con Brote Supresión

3. Epilepsias o Síndromes sin determinar si son generalizadas o focales

3.1 Con crisis generalizadas o focales

Crisis neonatales

Epilepsia Mioclónica Severa de la Infancia (Síndrome de Dravet)

Epilepsia con Punta-Onda Lenta durante el sueño

Afasia Epiléptica adquirida (Síndrome de Landau-Kleffner)

3.2 Sin claras crisis focales o generalizadas

4. Síndromes Especiales: *Addendum*. Ataques inesperados, fortuitos, cíclicos y producidos por factores sensoriales. Crisis prolongadas, “*status epilepticus*” (estado epiléptico), etc.

Actualmente la ILAE ha propuesto una nueva manera de clasificación del síndrome epiléptico, en el cual se propone una “simplificación” para su identificación, esta consiste en la clasificación dependiendo el tipo de crisis (parcial o generalizada) (Berg y cols., 2010); (Fig.7).

2.4.2 Epilepsia Refractaria o de difícil control

La persistencia de crisis epilépticas no provocadas, diagnosticadas con certeza, que interfieren con la vida diaria, suficientes para generar invalidez socio-laboral-escolar y producir insatisfacción personal, tras llevar un tratamiento con al menos dos fármacos antiepilépticos de primera línea, a las dosis máximas toleradas, con un cumplimiento impecable durante un periodo de dos años, que puede ser acortado en situaciones de especial gravedad, es conocida como epilepsia refractaria a medicamentos, farmacorresistente o también llamada de difícil control (Sánchez y cols., 2002, Orientación diagnóstica, 2013). En estos casos, la resección quirúrgica ofrece la última oportunidad terapéutica, siempre y cuando se identifique un foco discreto o zona epileptógena causante de las crisis (Villalobos y cols., 1995; Ryvlin y Rheims, 2008).

La zona epileptógena o foco epiléptico, es el sitio de la corteza cerebral donde inician las crisis, incluye tejido adyacente, que incluso sin ser originador de las crisis, es potencialmente epileptógeno (Cepeda y cols., 2006).

En la zona epileptógena se genera actividad paroxística que provoca la pérdida de la sincronía neuronal, en estado normal la generación simultánea de respuestas sinápticas en un grupo de neuronas, produce localmente un flujo de iones entre el espacio extracelular y el interior del grupo de células. Este flujo iónico produce un potencial de campo y de acción que es posible registrar en el espacio extracelular (Treviño y cols., 2007). El 70% de los pacientes epilépticos controlan sus crisis con fármacos antiepilépticos, para el restante 30% con epilepsia de difícil control, se aplican métodos no farmacológicos como la cirugía de epilepsia, dieta cetogénica, estimulación profunda y estimulación vagal entre otros (Sánchez-Alvarez y cols., 2002; Banerjee y cols., 2009).

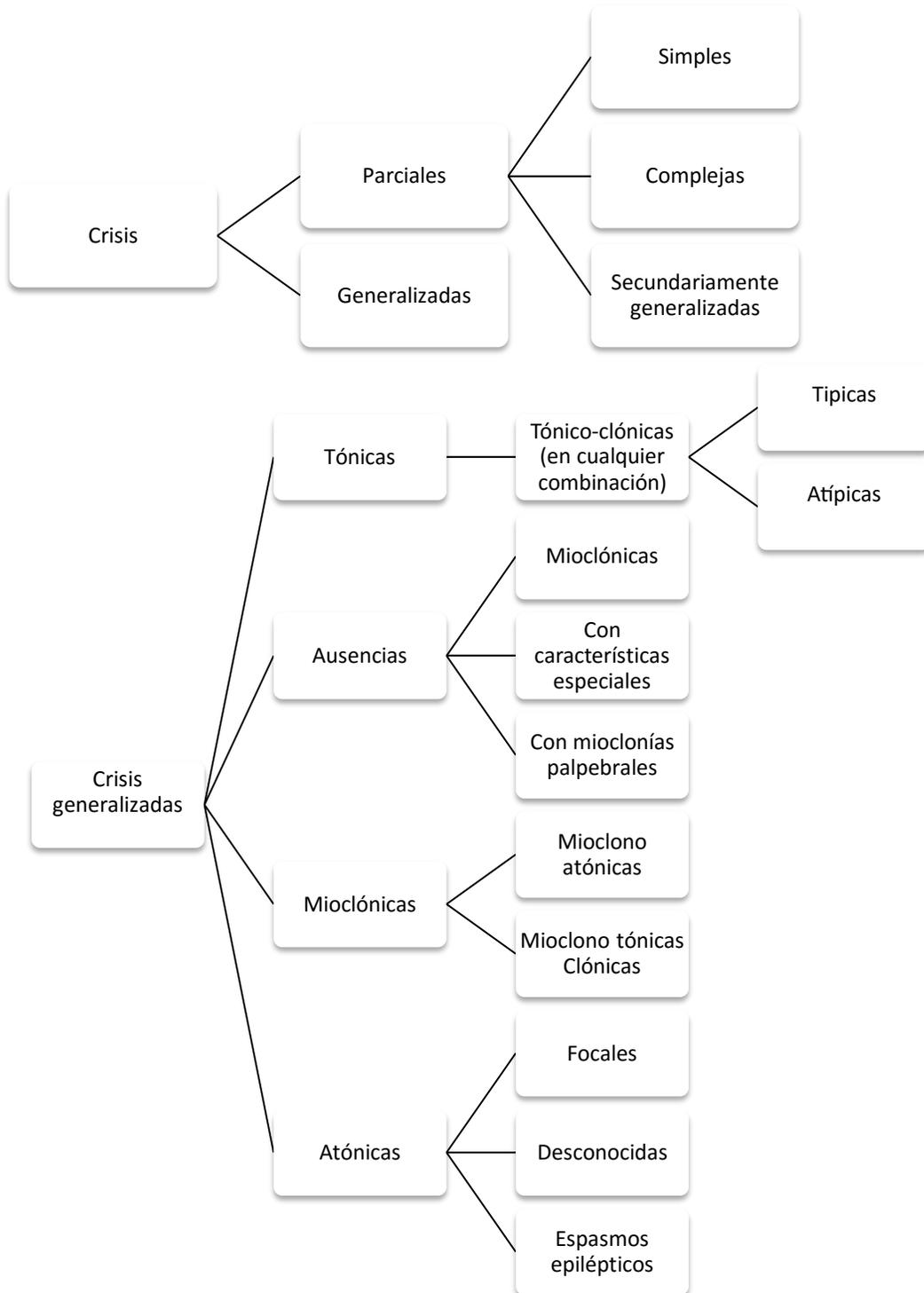


Figura 7. Clasificación de las crisis modificada de Berg T. y cols. (Berg y cols.,2010). La crisis que no se pueda incluir claramente en una de las categorías anteriores debería considerarse no clasificada hasta que nueva información permita su diagnóstico preciso.

2.4.3 Cirugía de epilepsia

La cirugía de epilepsia consiste en la delimitación de la zona epileptógena del paciente, por medio de un mapeo cerebral obtenido por corticografía transoperatoria, una vez delimitada la zona evitando que esta sea elocvente (que se encuentre en una región con funciones específicas no reemplazables, por ejemplo: la zona motora), se procede a la resección cortical. La resección generalmente consiste en una corticectomía, aunque dependiendo de la extensión, se pueden realizar corticectomías funcionales, lobectomías o resecciones más amplias (Villalobos y cols., 1995).

2.4.4 Patologías relacionadas con la epilepsia refractaria

Los sustratos patológicos identificados con mayor frecuencia en el foco epiléptico en pacientes pediátricos son:

- Malformaciones del desarrollo cortical del 12 al 38% (Mateos-Beato, 1999), donde la displasia cortical es la más frecuente como causa subyacente de las crisis parciales refractarias con el 5.5% de los pacientes pediátricos (Cepeda y cols., 2006).
- Esclerosis temporal mesial o esclerosis hipocampal con 15-40% de pacientes (Villalobos y cols., 1995).
- Tumores cerebrales benignos, alojados generalmente en los lóbulos frontal y temporal como gliomas, gangliogliomas, glioma subependimario de células gigantes, ependimomas, cavernomas y astrocitomas (Louis y cols., 2007), donde el 15 al 30% es más frecuente en infantes (Villalobos y cols., 1995).

Evidencia encontrada en tejido humano epileptógeno, indica que el tejido displásico mantiene propiedades de la etapa de inmadurez neuronal, mostrando mecanismos de inicio de crisis similares a lo observado durante el desarrollo del cerebro inmaduro (Aronica y cols., 2007). En los sustratos

resecaos se pueden encontrar neuronas dismórficas, las cuales presentan una excitabilidad aumentada y descargas espontáneas parecidas a crisis (Kerfooty cols., 1999).

2.4.5 Regulación del ácido gama aminobutírico (GABA) y epilepsia

La comunicación neuronal está regulada por la homeostasis entre las señales excitadoras o inhibitoras que reciben las neuronas. Al haber una alteración del equilibrio entre estas señales, ya sea por un aumento en la excitabilidad o una disminución en la inhibición, la actividad neuronal se descontrola y se puede presentar actividad hipersincrónica y paroxística, la cual posteriormente puede desencadenar crisis epilépticas.

Una de las razones por las cuales las redes neuronales pueden incrementar su excitabilidad en estados patológicos como la epilepsia, es por un cambio en el efecto del neurotransmisor GABA de hiperpolarizante (inhibidor) a despolarizante (excitador) (Cellot y Cherubini, 2013).

2.4.6 GABA

Uno de los principales neurotransmisores involucrados en la homeostasis celular es el aminoácido ácido gamma-aminobutírico, el cual inhibe la capacidad de respuesta de las neuronas para generar potenciales de acción, además de sincronizar las redes neuronales (Cossart y cols., 2005), así, el bloqueo de la neurotransmisión GABAérgica provoca actividad paroxística en tejidos sanos, mientras que sustancias potenciadoras del sistema GABAérgico evitan las crisis.

Existen evidencias en las cuales el GABA cambia su acción de inhibidor a excitador (Cossart y cols., 2005), lo cual está determinado por la concentración intracelular de cloruro que a su vez está regulada por la expresión de los cotransportadores de cloruro catión-Cl⁻: NKCC1 y KCC2 (Aronica y cols., 2007). Por lo que se ha postulado que una de las causas de la epilepsia se debe a un desbalance de la expresión de los cotransportadores de cloruro que alteran la concentración intracelular de cloruro, el cual ocasiona que la célula GABAérgica cambie su comportamiento de inhibidor a excitador.

2.5 Cotransportadores de cloruro NKCC1 y KCC2

Los cotransportadores NKCC1 y KCC2 son proteínas de membrana, isoformas de NKCC y KCC respectivamente, las cuales son parte de la familia transportadora de solutos 12 “*Solut Carrier Family 12*” (SLC12) y la familia catión-Cl⁻-cotransportador (CCC) (Medina y cols.,2014).

La familia CCC consta de tres grupos; NKCC ó Na-K-2Cl₂, KCC ó K-Cl₂ y NCC ó Na-Cl₂. Los cotransportadores NKCC y KCC son los reguladores de la homeostasis iónica en el sistema nervioso central (Payne y cols., 2003; Medina y cols., 2014).

2.5.1 NKCC

En el sistema nervioso central, NKCC es un cotransportador electro-neutral; se clasifica en dos isoformas NKCC1 y NKCC2. La proteína de membrana **NKCC1** o *SLC12A2* regula el volumen y la polaridad celular, por medio de la introducción de iones a la célula; se expresa en células gliales, neuronas, células endoteliales vasculares, células musculares, Plexos coroideos, y en la membrana basolateral de células secretoras epiteliales (Akiyama y cols., 2007; Payne y cols., 2003; Puskarjov y cols., 2014).

NKCC1 es activado por la fosforilación del dominio regulatorio ubicado en la terminal N de la molécula (Flemmer y cols. 2002). Las neuronas inmaduras se despolarizan en respuesta a la activación del receptor GABA_A en consecuencia a la acumulación activa de Cl₂ por su intrusión al citoplasma vía NKCC1 (Hübner y cols. 2001; Hübner, 2014).

2.5.2 KCC

Se han identificado cuatro isoformas de KCC, de estas cuatro KCC2 o *SLC12A5* es la única que se expresa exclusivamente en neuronas maduras (Williams y cols., 1999; Kahle y cols., 2010). Su función es extraer el cloro del citoplasma al espacio extracelular, esto induce despolarización de la membrana. Actualmente se ha probado que es una proteína estructural importante para la formación

y función de las espinas dendríticas en neuronas corticales. (Puskarjov y cols., 2014).

Ambos cotransportadores (NKCC1 y KCC2) son activados e inhibidos por medio de una red de fosforilación, cuando se detecta una concentración hipotónica o hipertónica de cloruro se inicia la fosforilación y la activación de osmosensores específicos cinasas serina-treonina, WNKs (“With no Lysine = K”, por sus siglas en inglés) y cinasas transductoras como la Ste20-tipo y OSR1 (Kahle y cols., 2008; Khale y cols., 2010).

En el cerebro inmaduro y en estados patológicos como la epilepsia, las neuronas presentan altas concentraciones intracelulares de cloruro debido a que existe una mayor expresión del cotransportador NKCC1. En consecuencia a esta alta concentración intracelular de Cl^- , los canales receptores GABA_A se abren, ocasionando que el cloruro salga de las neuronas, resultando en la despolarización de la membrana (ya que el cloruro posee carga negativa), generando un efecto excitador de la neurona, en la etapa inmadura o en estado patológico existe una alta expresión del cotransportador NKCC1 y una baja expresión de KCC2 lo que propicia que los niveles intracelulares de cloruro sean elevados, por lo que la activación del receptor GABA_A estimula la extrusión de los iones de cloruro al espacio extracelular, lo cual genera la despolarización de la membrana y en consecuencia el efecto excitador (Chamma y cols., 2012),(Fig.8).

2.6 Estudios de los cotransportadores en el tejido epiléptico

Se han llevado a cabo algunos estudios del cotransportador KCC2 desde que la proteína fue caracterizada por Williams y colaboradores en 1999. Aronica y colaboradores en 2007 realizaron un estudio semi-cuantitativo del cotransportador KCC2 en la sustancia gris de la corteza cerebral del tejido epiléptico donde se encontró un aumento de las neuronas inmunorreactivas a KCC2 (IR-KCC2) con diferentes patologías. Ese mismo año (2007), Munakata y cols. mencionaron que de manera cualitativa se aprecian pocas células IR-KCC2 en la sustancia blanca de tejido control. Sin embargo, en el estudio de Robinson y cols. (2010), se menciona que en la sustancia blanca dañada de infantes

pretérmino existe disminución de la expresión del cotransportador. Es importante mencionar que en los dos primeros estudios no existe separación de los resultados de los resultados provenientes de pacientes pediátricos y de los provenientes de adultos, además no se llevan a cabo comparaciones homologas de la corteza cerebral. Estos estudios se han llevado a cabo únicamente en algunos cortes del foco epiléptico, sin tomar en cuenta que el foco epiléptico no es una estructura unidimensional sino una estructura tridimensional. Hasta el momento, no existen reportes cuantitativos estereológicos de la expresión del cotransportador KCC2 en la sustancia blanca del foco epiléptico de pacientes pediátricos exclusivamente. Estos resultados podrían ayudar a entender el fenómeno *in situ* y buscar nuevos blancos terapéuticos para las crisis de la epilepsia de difícil control.

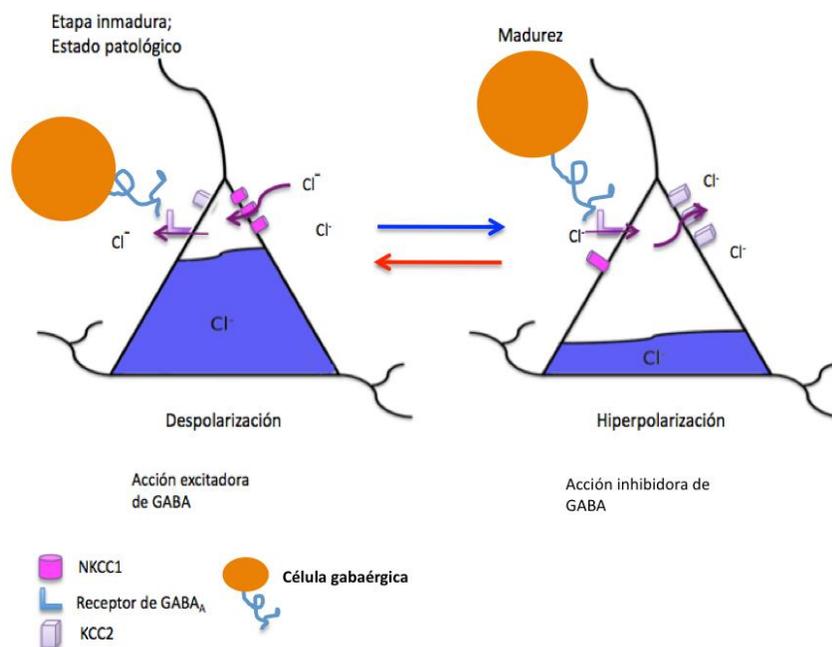


Figura 8. En la etapa madura, las neuronas expresan mayor cantidad del cotransportador KCC2, el cual al extraer iones de Cl^- mantiene la concentración intracelular de iones Cl^- baja a comparación del espacio extracelular, en este caso la apertura de los canales de GABA_A introducen iones Cl^- , hiperpolarizando la membrana neuronal, ocasionando un efecto inhibitor. En la etapa inmadura o en estado patológico (epiléptico) existe una alta expresión del cotransportador NKCC1 y una baja expresión de KCC2 lo que propicia que los niveles intracelulares de Cl^- sean elevados, por lo que la activación del receptor GABA_A estimula la extrusión de los iones Cl^- al espacio extracelular, generando la despolarización de la membrana y como consecuencia un efecto excitador. La flecha azul indica el proceso normal de maduración, mientras la flecha roja indica el proceso de estado patológico (Imagen modificada de Ben Ari, 2002).

3. Justificación

Existen estudios realizados en la sustancia gris de la corteza cerebral que han confirmado que la desregulación en la expresión del cotransportador KCC2, es uno de los factores que desencadena las crisis en la epilepsia de difícil control o refractaria, sin embargo, estudios cuantitativos más detallados sobre los cotransportadores son necesarios para revelar los mecanismos de regulación. Actualmente no existe un reporte cuantitativo estereológico sobre la expresión del cotransportador KCC2 en la sustancia blanca. Este trabajo puede formar parte de los estudios que se tomen como referencia para otros análisis, que posteriormente permitan encontrar nuevos blancos terapéuticos y fármacos, que permitan controlar las crisis, brindando una mejor calidad de vida a los pacientes con epilepsia de difícil control.

4. Hipótesis

El número de células que expresan KCC2 será menor en la sustancia blanca del foco epiléptico resecado en la cirugía de epilepsia en comparación con el tejido proveniente de autopsias de individuos sin afecciones del sistema nervioso central.

5. Objetivo general

Cuantificar por métodos estereológicos la expresión del cotransportador KCC2 en la sustancia blanca del foco epiléptico, resecado en la cirugía de epilepsia de pacientes pediátricos refractarios a medicamentos.

6. Objetivos particulares

- Caracterización clínica de los pacientes sometidos a cirugía de epilepsia.
- Caracterización patológica de los individuos sometidos a autopsia.
- Estandarizar la técnica de inmunodetección contra KCC2 en sustancia blanca del foco epiléptico y de autopsias en edad pediátrica para su cuantificación por medio de estereología.
- Cuantificar el número de células con inmunorreactividad al cotransportador KCC2 en sustancia blanca del foco epiléptico y autopsias en edad pediátrica.

7. Material y métodos

Este trabajo corresponde a un estudio de tipo prospectivo, transversal, observacional, descriptivo con número de registro en el Instituto Nacional de Pediatría 48/2008.

Debido a que las muestras de tejido cerebral humano se obtuvieron en pequeñas cantidades y con poca frecuencia, además de que ésta línea de investigación era nueva en el Laboratorio, inicialmente se realizó la estandarización de la técnica de inmunohistoquímica en tejido cerebral de ratas y posteriormente se trabajó en el tejido procedente del foco epiléptico y autopsias.

7.1 Anticuerpos

En este trabajo de tesis tanto para los tejidos de rata como de humano se utilizó el anticuerpo primario KCC2 policlonal desarrollado en conejo (Millipore, USA) y como anticuerpo secundario se utilizó el IgG biotilnado anticonejo desarrollado en cabra (Vector, USA).

7.2 Estandarización de los reactivos para inmunohistoquímica en tejido de rata

La técnica inmunohistoquímica se estandarizó en tejido cerebral de rata macho adulto de la cepa Sprague-Dawley. Los animales se perfundieron vía intracardiaca con solución salina al 0.9% y posterior fijación con paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1 M (PFA-PB), (Fig.9). Posteriormente se extrajo el encéfalo que se crioprotegió en solución de sacarosa al 30% y se congelo en 2-metil butano mantenido en hielo seco (CO₂). Se obtuvieron cortes cerebrales coronales seriados de 50 micras de grosor, mediante el uso de un criostato (Leica Cryocut 1800), y se almacenaron individualmente en solución anticongelante a 4°C.

Se utilizó el anticuerpo primario KCC2 1:2000 y el anticuerpo secundario anticonejo 1:500, con un tiempo de revelado en diaminobencidina de 2 minutos. Se realizaron controles negativos mediante la omisión del anticuerpo primario o secundario.

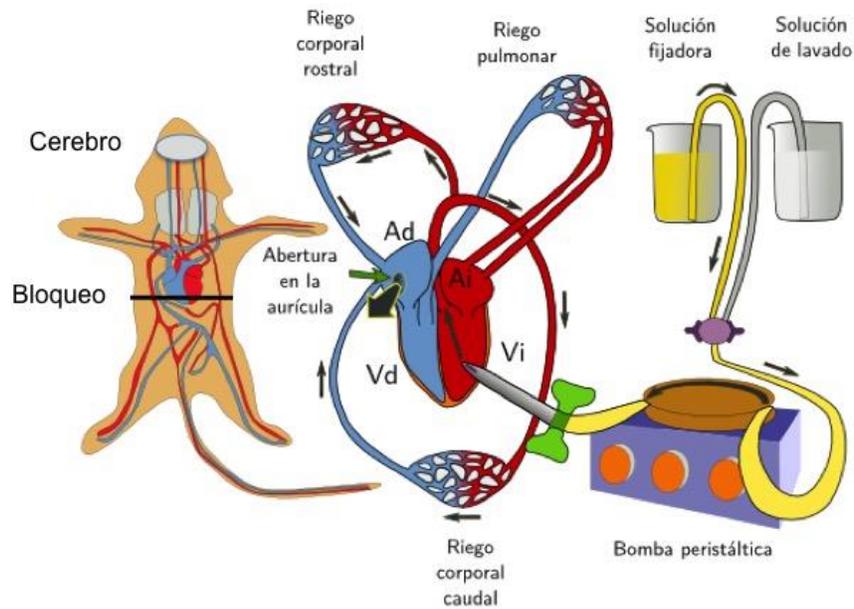


Figura 9. Proceso de perfusión con bloqueo de arterias y venas inferiores. (Imagen modificada de <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/2-metodos-fijacion.php>).

7.3 Procesamiento del tejido proveniente de humanos

7.3.1 Obtención de las muestras

Las muestras de tejido de la corteza cerebral que se tomaron como control, se obtuvieron de las disecciones de autopsias en el Departamento de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Pediatría (INP), y del anfiteatro del Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO), de 2009 a 2014, con asesoramiento de los médicos patólogos. Las muestras corresponden a individuos en edad pediátrica sin afecciones del sistema nervioso central con un tiempo post-mortem menor a 10 horas.

Las muestras de la zona epileptógena se obtuvieron en las cirugías de epilepsia de pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría (INP), y del Hospital "Humanitas Medical Group" (HMG), que se llevaron a cabo en el periodo comprendido de 2009 a 2014. Las cirugías de epilepsia fueron realizadas por los neurocirujanos de las respectivas instituciones, en este tipo de cirugía se llevó a cabo la exéresis del área epileptógena ó foco epiléptico, como medida terapéutica para controlar las crisis de pacientes con epilepsia de difícil control. Todos los pacientes fueron sometidos

a un monitoreo electrofisiológico intraoperatorio, con la ayuda de una malla de electrodos para delimitar la zona con actividad eléctrica cortical paroxística. Posteriormente el neurocirujano removió completamente la zona epileptógena empleando el procedimiento quirúrgico idóneo para cada caso.

7.4 Criterios de inclusión y exclusión

7.4.1 Criterios de inclusión de los individuos sometidos a autopsia

1. Individuos de ambos géneros.
2. Edad entre 1 mes y 18 años.
3. Individuos que no presentaron alteraciones neurológicas o tratamientos con afección al sistema nervioso central.

7.4.2 Criterios de exclusión de los individuos sometidos a autopsia

1. Individuos que presentaron crisis convulsivas o epilépticas sin diagnóstico definitivo.
2. Individuos con enfermedades metabólicas o síndromes.
3. Individuos con alteración en el sistema nervioso central.

7.4.3 Criterios de inclusión de los pacientes pediátricos con cirugía de epilepsia

1. Pacientes con tratamiento quirúrgico por epilepsia de difícil control del INP.
2. Pacientes de ambos géneros.
3. Edad entre 1 mes y 18 años.
4. Pacientes con epilepsia parcial o generalizada de difícil control.
5. Pacientes que fueron tratados farmacológicamente con al menos dos fármacos de primera indicación, por un lapso de 6 meses, con seguimiento de niveles séricos de los antiepilépticos y sin mejoría clínica o empeoramiento de la epilepsia.
6. Pacientes cuya epilepsia les impidió realizar actividades cotidianas propias de su edad y que presentaron deterioro de su calidad de vida.

7.4.4 Criterios de exclusión de los pacientes pediátricos con cirugía de epilepsia

1. Pacientes con enfermedades heredo-degenerativas, metabólicas, concomitantes y/o progresivas.

7.5 Datos clínicos

Se revisaron los expedientes de autopsias y expedientes clínicos de los pacientes con cirugía de epilepsia para obtener los siguientes datos: género, edad, diagnóstico patológico, etiología de la epilepsia, duración de la epilepsia, tipo de crisis, localización, lateralidad, cirugía, interpretación de resonancia magnética, interpretación de electroencefalograma, fármacos antiepilépticos. Se realizaron bases de datos y se organizaron en cuadros y gráficas.

7.6 Procesamiento de los tejidos

7.6.1 Estandarización de la concentración para inmunohistoquímica en tejido cerebral humano.

Una vez probados los reactivos en el tejido cerebral de rata se realizó la estandarización de la inmunodetección contra KCC2 en cortes de corteza cerebral de autopsia, donde se probaron las concentraciones de AB primario contra KCC2 1:2000, 1:200 y 1:50.

7.6.2 Fijación

Las muestras de autopsias obtenidos de las autopsias por los patólogos y técnicos se fijaron en una solución de formol (Merck) al 10%, durante diez días. Posteriormente se procedió al corte coronal del encéfalo en rebanadas de aproximadamente 1cm de grosor. De cada individuo se recolectaron de forma bilateral muestras de 1 cm³ de volumen mínimo de la corteza frontal, parietal, temporal, occipital e hipocampo. La post-fijación se realizó con PFA al 4% a 4°C. Las muestras de tejido resecado en la cirugía de epilepsia y del INCIFO se fijaron por inmersión en PFA-PB al 4% a 4°C durante diez días.

Posteriormente las muestras se crío-protegieron en buffer de fosfatos 0.1 M - sacarosa al 30% hasta que el tejido quedó completamente sumergido en el contenedor.

Después los tejidos se congelaron rápidamente sumergiéndolos en 2-metil butano (Sigma-Aldrich, USA), enfriado con hielo seco (CO₂), por 2 minutos (dependiendo del tamaño de la muestra), almacenándolos en un ultracongelador (Thermo Scientific), a -70°C.

Se obtuvieron cortes coronales y seriados de 50 micras con la ayuda del criostato Leica (CRYOCUT 1800), a -19°C y se depositaron en una solución anticongelante para almacenarlos individualmente a 4°C, en placas de cultivo de 24 pozos.

7.6.3 Selección de cortes para procesar

La selección de los cortes se llevó a cabo de manera aleatoria y sistemática, del conjunto de cortes seriados, el primer corte se tomó al azar entre los primeros ocho y posteriormente cada octavo corte hasta el final (Gómez-Lira y cols., 2011).

7.6.4 Inmunohistoquímica biotilínada

Los cortes se procesaron mediante la técnica de inmunohistoquímica biotilínada para KCC2, que se llevó a cabo por libre flotación, en paralelo, agitación constante y a temperatura ambiente, excepto la incubación con el anticuerpo primario y el desenmascaramiento con buffer de citratos (Fig.10). Se realizaron blancos de las muestras suprimiendo el anticuerpo primario o el secundario.

Finalmente, los cortes se montaron en portaobjetos cubiertos con gelatina y se cubrieron con Entellan neu* (Merck, Alemania), y cubreobjetos. A cada preparación se le asignó una clave para que el observador no conociera su procedencia.

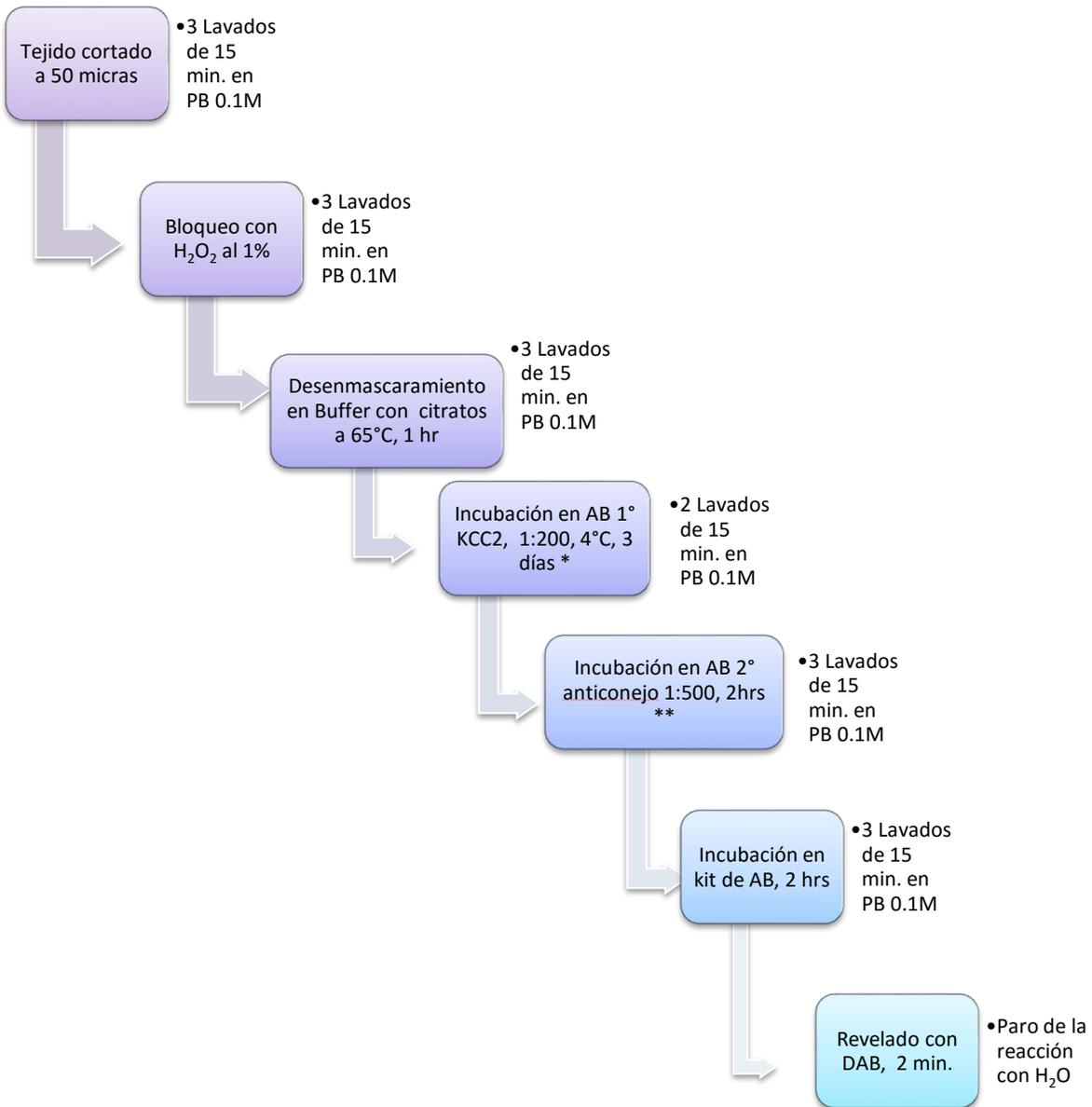


Figura 10. Diagrama de la técnica inmunohistoquímica biotilina contra KCC2 en tejido humano. *El anticuerpo (AB) primario se diluyó en PB 0.1 M, suero de caballo 10% y Tween 20 al 0.1%. **El anticuerpo secundario se diluyó en PB 0.1 M y suero caballo al 5%.

7.7 Conteo de células

El conteo de células inmunorreactivas a KCC2 se llevó a cabo en la sustancia blanca de manera sistemática y aleatoria, en un sistema de imágenes, (microscopio BX-51; Olympus, Japón), y se

analizaron las imágenes con el software estereológico (MBF Bioscience, USA). Para obtener el número total de células inmunorreactivas a KCC2 se utilizó el fraccionador óptico.

Se formaron dos grupos de análisis en base al volumen de la sustancia blanca; el grupo A consistió de muestras con un volumen promedio menor de 30 mm³, mientras que el volumen promedio del grupo B fue de 100 mm³. El conteo fue realizado con un objetivo de 60X. Se establecieron tres niveles de tinción celular: débil, moderado e intenso. De todas las muestras se obtuvo el diagnóstico histopatológico.

7.7.1 Criterios de inclusión de las muestras procesadas

1. Tejidos identificados y preservados adecuadamente en PFA-PB.
2. Tejidos con volumen mínimo de 1cm³.
3. Tejidos cortados de manera seriada, sin rasgaduras ni melladuras.
4. Tejidos que se procesaron en paralelo con el mismo lote de anticuerpos y técnica, respetando tiempos y temperatura.
5. Tejidos montados en cubreobjetos gelatinizados al final del proceso de inmunohistoquímica, que no presenten dobladuras ni arrugas en su superficie y cubiertos uniformemente con resina sintética y cubreobjetos.

7.8 Análisis estadístico

Los datos clínicos obtenidos se procesaron con estadística descriptiva, graficando los porcentajes. Los datos obtenidos del número de células inmunorreactivas a KCC2 se graficaron en base al promedio y desviación estándar y posteriormente se procesaron con el programa estadístico SPSS V20 ("Statistical Package for Social Studies", Versión 20). Primero se aplicó la prueba de homocedasticidad de varianzas de Levene, si el valor obtenido era significativo se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, de lo contrario se aplicó la prueba estadística t de Student tomando una $p \leq 0.05$ para considerar significativo el resultado.

8. Resultados

8.1 Manejo clínico del paciente con epilepsia

Todos los pacientes con epilepsia de difícil control que fueron sometidos a cirugía de epilepsia en el INP tuvieron el siguiente manejo clínico. Inicialmente los pacientes ingresaron y fueron valorados por un médico pediatra y un neurólogo, posteriormente en caso de sospecha fueron canalizados al departamento de neurología donde se revaloraron y se refirieron a la clínica de epilepsia. Aquí fueron diagnosticados y se les proporciono tratamiento farmacológico dependiendo de la sintomatología de la epilepsia. El paciente se mantuvo en evaluación constante; si respondía adecuadamente al tratamiento se realizaba un seguimiento, control de la enfermedad y evaluación periódica. Sin embargo, si no respondía al tratamiento y se diagnosticaba epilepsia de difícil control, los posibles candidatos se discutieron en una sesión multidisciplinaria, donde se determinó si era candidato a cirugía o no. En caso de ser candidato, fue evaluado por Anestesiología y Neurocirugía para determinar el tipo de procedimiento y fecha de la cirugía. Después de la cirugía se realizaron consultas de control y seguimiento. Si el paciente no era candidato se mantuvo vigilado y se ofrecieron cuidados paliativos (Fig. 11).

8.2 Datos clínicos de los pacientes con cirugía de epilepsia

Se reclutaron 10 pacientes, de los cuales 6 cumplieron los criterios de inclusión para el estudio morfológico. En el cuadro 3, se describen los datos generales de los 10 pacientes sometidos a cirugía de epilepsia en el INP y en el HMG en el periodo de 2009 a 2014. El 40% de los pacientes fueron del género masculino y 60% del género femenino. La edad promedio fue de 8.5 años, con un rango de 4 meses a 16 años con 6 meses. El rango de la duración de la epilepsia fue de 2 meses a 12 años con 6 meses, con un promedio de 4 años con 6 meses. La epilepsia parcial predominó en los diagnósticos clínicos (60%), el diagnóstico patológico predominante fueron los cambios hipóxicos (40%), seguido

de displasia cortical (20%), ganglioglioma (20%), e inflamación (10%). La etiología de la epilepsia fue de origen sintomático en el 90% de los casos, mientras que el 10% fue de origen criptogénico.



Figura 11. Manejo clínico de los pacientes con epilepsia en el Instituto Nacional de Pediatría.

8.3 Crisis epilépticas

En el cuadro 4 y figura 12 se muestra la edad de inicio, el tipo y la frecuencia de las crisis epilépticas prequirúrgicas y posquirúrgicas de los pacientes. El rango de edad del inicio de las crisis fue de 4 meses a 10 años con una media de 3.6 años. En los registros preoperatorios predominaron las crisis parciales con un 40%, las crisis tónicas con el 30%, tónicas generalizadas con el 10%, mioclonias 10% y crisis no especificadas 10%.

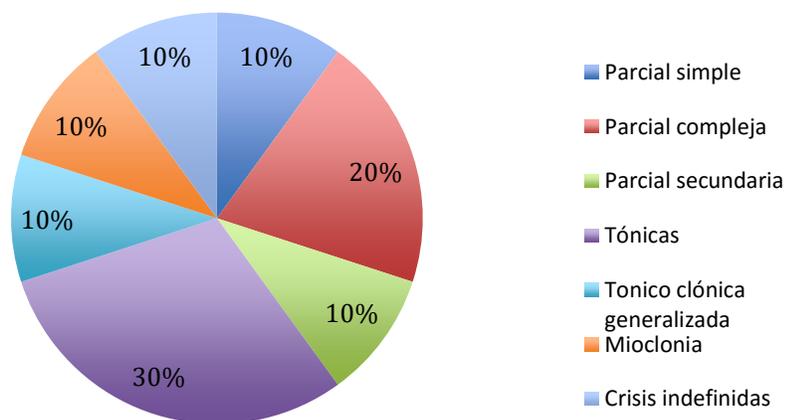
Como puede observarse, las crisis postquirúrgicas que predominan son las parciales (30%) y la ausencia de crisis (30%), seguidas de las crisis tónicas (20%), crisis generalizadas (10%) y en el 10% restante no se ha reportado la evolución del paciente.

En el cuadro 4 también se puede observar que después de la cirugía, en cuanto al control de crisis hubo una mejoría en el 100% de los pacientes, el 30% de ellos dejaron de manifestar crisis, mientras el 60% restantes disminuyeron la cantidad de eventos al día, del 10% no se encontró el reporte.

8.4 Exámenes de Resonancia Magnética

En el cuadro 5, se resumen los datos de las interpretaciones de las resonancias magnéticas pre y postquirúrgicas de los pacientes con intervención quirúrgica. Los estudios prequirúrgicos describen los hallazgos más importantes; no se encontraron datos de tres de los diez pacientes, 20% presenta displasia localizada, 10% probable displasia, 10% encefalomalasia, 10% tumoración, 10% desviación septal, 10% atrofia cerebral, cerebelar y quiste aracnoideo. Por otro lado, los datos postquirúrgicos reflejan cambios anatómicos debido a la intervención quirúrgica.

Crisis prequirúrgicas



Crisis postquirúrgicas

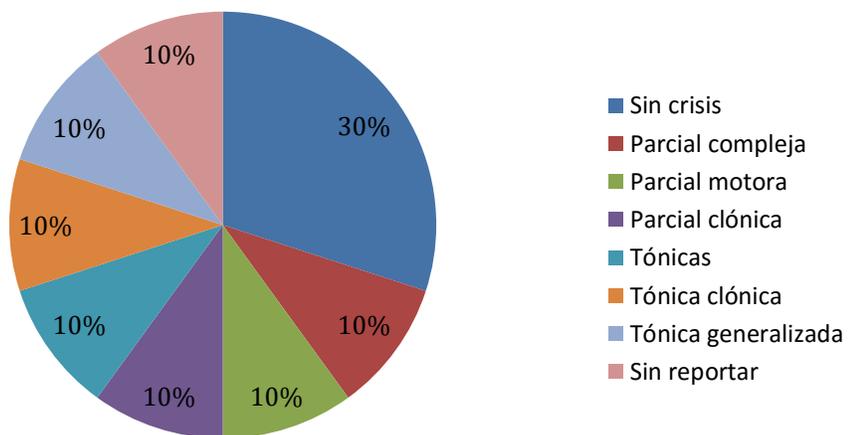


Figura 12. Porcentajes del tipo de crisis prequirúrgicas y postquirúrgicas de los pacientes.

Cuadro 3. Datos generales y diagnóstico de los pacientes.

Paciente	Genero	Edad * (años. meses)	Duración de la epilepsia (años. meses)	Diagnóstico clínico / Tipo de epilepsia	Etiología de la epilepsia	Diagnóstico Patológico
1	M	11.2	3.2	Epilepsia parcial farmacorresistente.	Parcial criptogénica	Corteza con retracción neuronal hipóxica y gliosis reactiva.
2	F	11	1	Epilepsia parcial compleja, sintomática a displasia cortical.	Sintomática	Inflamación y fibrosis meníngea, cambios neuronales inespecíficos con gliosis acentuada, inflamación por linfocitos T en parénquima cerebral
3	F	1.9	1.5	Epilepsia parcial compleja secundariamente generalizada.	Sintomática	Ganglioglioma en lóbulo temporal izquierdo
4	F	6.10	4.10	Epilepsia parcial compleja secundariamente generalizada de difícil control, refractaria a medicamentos.	Sintomática	Enfermedad cerebrovascular. Alteraciones hipóxicas isquémicas
5	M	16.6	12.6	Epilepsia parcial compleja de difícil control.	Sintomática	Cambios reactivos e hipoxia
6	F	6.6	6	Tumoración temporal derecha (ganglioglioma) y epilepsia sintomática.	Sintomática	Ganglioglioma
7	M	11.4	7.4	Sdx. Lenox Gastaut con epilepsia.	Sintomática	Encefalopatía hipóxica con desmielinización segmentaria, gliosis y encefalitis crónica leve e inespecífica.

8	F	0.4	0.2	Epilepsia Parcial Sintomática a displasia cortical.	Sintomática	Displasia y cambios hipóxicos neuronales.
9	F	7	5.6	Epilepsia de difícil control secundaria a enfermedad vascular cerebral, Síndrome de neurona motora superior y síndrome piramidal.	Sintomática	Displasia neuronal cortical tipo II.
10	M	13	No consignado	Epilepsia de difícil control secundaria a displasia cortical.	Sintomática	Displasia cortical.

* Edad al momento de la cirugía; Sdx: síndrome.

Cuadro 4. Descripción y frecuencia de las crisis en los pacientes.

Paciente	Edad de inicio de las crisis	Tipo de crisis		Cantidad de crisis por día	
		Prequirúrgicas	Postquirúrgicas	Prequirúrgicas	Postquirúrgicas
1	9 años	Crisis convulsivas parciales complejas secundariamente generalizada.	Crisis Parciales complejas, nocturna hipertónicas con movimiento de extensión generalizado al inicio de sueño.	5	3
2	10 años	Mioclónicas con supravversión de la mirada aumento del tono de las 4 extremidades y movimientos clónicos de duración mayor de 5 minutos.	Crisis parciales clónicas de miembro torácico y pélvico izquierdo, durante la noche incontables durante la consulta 3 breves con pérdida de la interacción.	Hasta 6 por hora	Control del 50% de las crisis
3	4 meses	Crisis de ausencia que evolucionan a crisis parciales simples secundarias con movimientos tónico clónico.	Sin crisis.	4 a 5	0
4	2 años	Crisis parciales secundarias generalizadas.	Crisis convulsivo tónico generalizadas	4 a 6	Mejor control de las crisis
5	4 años	Crisis tónico-clónicas generalizadas con 10 segundos de duración.	Crisis cada 4 días en las noches, caracterizadas por movimientos clónicos en mano derecha y aumento de manera generalizada.	6 a 8	Cada 4 días
6	6 meses	Crisis tónicas, caracterizadas por fijación de la mirada, cianosis peribucal e hipertonia de miembros superiores.	Sin crisis.	Sin dato	0

7	4 años	Crisis parciales complejas de pocos segundos de duración.	Crisis nocturnas con sonidos guturales salivación y desviación de la mirada -> crisis parcial motora con movimientos tónico clónicos en hemicuerpo derecho con generalización secundaria.	15 matutinas	1 nocturna
8	2 meses	Crisis tónicas asimétricas y superversión de la mirada con duración de tres minutos posteriormente bilaterales aisladas.	Crisis tónicas asimétricas bilaterales.	Hasta 8 por hora	2 a 3
9	3 años	Hipertonía, superversión de la mirada, movimientos tónicos clónicos generalizados.	Sin crisis.	1 a 3 exacerbación hasta 30	0
10	Sin consignar	Sin consignar.	Sin consignar	Sin consignar	Sin consignar

8.5 Exámenes de electroencefalografía (EEG)

El cuadro 6, resume los principales resultados de los EEG prequirúrgicos y postquirúrgicos en los pacientes. El 20% de los pacientes no tiene registro de los reportes en el expediente, el 80% de los pacientes presento actividad paroxística; al 30% del total se les reportó lentificación focal y 10% lentificación generalizada, mientras que el 20% de los pacientes presentan actividad de base lenta para su edad; el 10% de los pacientes no presentan grafoelementos propios del sueño y el 10% presentan movimientos sin correlación con los eventos paroxísticos.

En los exámenes postquirúrgicos, no se encontró el reporte del EEG de un paciente (10%), el 80% siguió presentando actividad paroxística, se reportó 20% con lentificación focal y 10% con lentificación generalizada, 40% con actividad de base lenta para la edad de los pacientes, 30% presentaron pobre estructuración de grafoelementos propios del sueño y el 10% presentó movimientos sin correlación con la actividad paroxística.

Cuadro 5. Exámenes de resonancia magnética de los pacientes sometidos a cirugía.

No. de paciente	1	2	3	4	5	6
Prequirúrgicos	Desviación septal.	No reportado	Discreta atrofia cerebral y cerebelosa, quiste aracnoideo temporal izquierdo.	Displasia cortical focal FI. Aspecto quístico de la cisterna magna en ambos lados de la línea media a considerar mega cisterna magna.	Tumoración intra axial localizada hacia el uncus TI, con características de espectroscopia compatibles con neoplasia de bajo grado de malignidad.	No reportado
Post quirúrgicos	Cambios qx. por craneotomía frontoparietal izquierda, asociado a encefalomalasia córtico-subcortical frontal ipsilateral con hematoma en el lecho y datos de necrosis laminar cortical.	No reportado	No reportado	Cambios qx. por craneotomía parietal derecha asociada a zonas de encefalomalacia córtico-subcorticales en región frontal izquierda. Atrofia cerebelosa córtico-subcortical de etiología por determinar. Aspecto quístico de la cisterna magna.	Cambios qx. sin evidencia de tumoración residual o recidivante. Gliosis peritrigonal, de tipo inespecífico.	Cambios qx. por craneotomía FTD asociada a encefalomalacia córtico subcortical T ipsilateral, sin evidencia de actividad tumoral en el momento presente.

No. de paciente	7	8	9	10
Prequirúrgicos	Hemiatrofia cerebral y de tallo cerebral, con displasia cortical izquierda, con áreas de agriopaqüigiria y polimicrogiria Engrosamiento mucoso esfenoidal.	Probable zona de displasia cortical focal frontal derecha; atrofia cerebral córtico subcortical progresiva.	Encefalomalasia frontotemporal izquierda.	Sin dato.
Post quirúrgicos	Cambios qx. por craneotomía FPTI, asociada a encefalomalasia córtico-subcortical en el polo F ipsilateral. Se observa edema o gliosis circundante, hay callosotomía en la parcial a nivel del genus, con edema difuso que da la impresión de interrupción de fibras en la tractografía.	Procencefalia en área de resección quirúrgica frontal derecha.	Cambios qx. del cráneo, hematoma subgaleal Izquierdo, Hematoma subdural, izquierdo. Cambios qx. en el hemisferio cerebral izquierdo.	Sin dato.

P: Paciente, qx.: Quirúrgicos, F: Frontal, FI: Frontal izquierdo, FTD: Frontotemporal derecho, T: Temporal, TI: Temporal izquierdo, FPTI: Frontoparietotemporal izquierdo.

Cuadro 6. Exámenes electroencefalográficos de los pacientes

No. de paciente	1	2	3	4	5
Prequirúrgicos	Alteración paroxística por la presencia de ondas agudas de alta frecuencia, puntas de bajo voltaje principalmente en la región F y C. Lentificación focal y generalizada con correlato clínico-electrónico, actividad de base lenta para la edad del paciente.	Lentificación FD, CD, PD; Actividad paroxística de ondas agudas en región F sin presencia de movimientos anormales; movimiento con actividad paroxística de ondas agudas en región FD, la mayoría de los movimientos sin correlato de actividad paroxística.	Lentificación generalizada de predominio en región FI y TI. Actividad paroxística de puntas y ondas agudas en región FI y TI. Escasa integración de grafoelementos de sueño.	Severa alteración paroxística por la presencia en forma continua de ondas agudas y ondas lentas de alto voltaje en la región FM, CM, PM y región FI, CI, PI.	Lentificación y actividad paroxística aislada de puntas en región CI y FI. Mapeo de amplitud muestra inicio y mayor electronegatividad de la punta en región CI.
Postquirúrgicos	Actividad de base lenta para la edad del paciente, pobre integración de grafoelementos propios del sueño, actividad paroxística generalizada con mayor voltaje en las regiones F de predominio izquierdo.	Lentificación en la región CD, punto paroxístico por la presencia de un proceso imitativo en la región FCD.	Lentificación generalizada por la presencia de brotes de ondas lentas y de algunas ondas agudas. Aislada actividad paroxística en la región central. Actividad de base lenta para la edad del paciente. Escasa estructuración de grafoelementos propios del sueño.	Actividad paroxística de puntas y ondas agudas, complejo punta onda atípico en región O y T, la mayoría de movimientos no correlaciona con la actividad paroxística.	Lentificación focal en la región F bilateral por la presencia de ondas lentas delta de predominio hemisferio cerebral izquierdo. Sin la presencia de fenómenos irritativos corticales.

No. de paciente	6	7	8	9	10
Prequirúrgicos	No reportado	Actividad paroxística por la presencia de un proceso irritativo continuo, de predominio en la región FI y CI, con generalización.	Actividad de base lenta para la edad del paciente con predominio en la región FD, CD, TD; adecuada integración de grafoelementos propios del sueño; actividad epileptiforme en sueño en la región TD; actividad epileptiforme ictal en la región FD, CD, TD.	Frecuente actividad epileptiforme en región CPI que difunde a TOI, en forma independiente y no frecuente, se registran puntas y ondas agudas en región FTI y escasas polipuntas, ondas agudas y puntas en regiones FC.	Sin consignar
Postquirúrgicos	Actividad paroxística de puntas dentro de actividad rápida, con electrodecremento en región TD. En sueño presenta actividad paroxística de puntas generalizadas en brote delta de un segundo de duración.	Actividad epileptiforme generalizada con mayor amplitud en la región TI.	Actividad de base lenta para la edad del paciente con predominio D; no hay integración de grafoelementos propios del sueño en D; hay frecuente actividad epileptiforme TPI y OI; Aislada actividad epileptiforme en la región TPI y OD como focos independientes.	Sin actividad epileptiforme, actividad de base lenta para la edad del paciente pobre estructuración de grafoelementos propios del sueño en I; asincrónica por actividad más lenta en el hemisferio cerebral izquierdo con predominio en la región FCI.	Sin consignar

F: Frontal, FD: Frontal derecho, FI: Frontal izquierdo, FC: Frontocentral, FCD, Fronto central derecho, FM: frontal medio, C: región central, CD: central derecha, CI: central izquierda, T: temporal, TI: Temporal Izquierdo, TD: Temporal derecho, TPI: Temporo parietal izquierdo, TOI: Temporo occipital izquierdo, PI: Parietal izquierdo, PM: Parietal medio, D: hemisferio cerebral derecho, I: hemisferio cerebral izquierdo.

8.6 Fármacos antiepilépticos

En el cuadro 7 se reportan los fármacos antiepilépticos que se administraron desde el primer tratamiento hasta 3 años postquirúrgicos. El 70% de los pacientes fueron tratados con polifarmacia, excepto el 20% que tiene diagnóstico de ganglioglioma que se trató con monoterapia y del 10% restante no se encontró reportado el dato.

En el primer tratamiento de los pacientes el fármaco más usado fue el AVP (40%), seguido de OXC (30%), DFH (20%) y BDZ, CBZ y CLB con el 10% cada uno. Los fármacos antiepilépticos más usados prequirúrgicamente (1 mes previo a la cirugía) fueron: LVT y DFH en el 50% de los pacientes, los fármacos antiepilépticos TPM y CLB fueron administrados al 40% de los pacientes, le siguieron los fármacos AVP, LMT en el 20% de los pacientes, y finalmente el MDZ, PRM, CLN, ETX y FN, con un 10% cada uno.

En cuanto a los fármacos antiepilépticos, un mes después de la cirugía, se encontró que los fármacos más usados fueron: CLB administrados al 60% de los pacientes, TPM, LVT y DFH en el 40%, ETX en el 20% y finalmente FN, OXC, HRK, ETX, cada uno en el 10% de los pacientes. Al año postquirúrgico el fármaco más utilizado es LVT (60%), seguido de AVP (30%) y TPM (30%), el 20% de los pacientes se mantuvieron en monoterapia. A tres años postquirúrgicos no obtuvieron los datos del 30% de los pacientes, 10% siguió en monoterapia, 10% quedó libre de fármacos antiepilépticos, y el fármaco más utilizado fue el LVT (30%).

Cabe mencionar que 20% de los pacientes fueron tratados con DFH ó FN junto con otros fármacos durante el periodo postquirúrgico, el 10% quedó libre de crisis a los 3 años postquirúrgicos.

En el periodo postquirúrgico inmediato se redujeron el número de fármacos antiepilépticos administrados en el 40% de los pacientes, el otro 40% mantuvieron el mismo número de fármacos

antiepilépticos y un paciente (10%) aumentó el número de fármacos, no se obtuvo el dato de 1 paciente (10%).

A un año postquirúrgico el 30% de los pacientes disminuyeron la cantidad de fármacos consumidos, el 50% mantuvo la misma cantidad de fármacos consumidos modificando la dosis, el 10% aumento un fármaco a su tratamiento y del 10% no se consignó el dato. El fármaco más utilizado es el LVT seguido del TPM.

Tres años postquirúrgicos el 10% queda libre de fármacos, 30% no se puede evaluar, 10% aumenta un fármaco a su tratamiento, 10% disminuye un fármaco, el 30% mantiene el mismo número, pero cambian de fármacos y dosis en el tratamiento mientras el 10% no se pudo consignar posterior a los 3 años un paciente suspende el uso de fármacos.

La duración del tratamiento prequirúrgico tuvo un rango de 10 meses a 8 años con 4 meses, con un promedio de 3 años con 9 meses. No se obtuvo el registro de la duración del tratamiento de 5 pacientes.

En el último registro de fármacos 20% aumentan un fármaco al tratamiento, 20% permanece libre de medicamentos, 10% se mantiene sin consignar.

Cuadro 7. Fármacos antiepilépticos administrado a los pacientes.

Paciente	Primer tratamiento	Prequirúrgico 1 mes	Post quirúrgicos inmediato	Post quirúrgico 1 mes	Post quirúrgico 1 año	Post quirúrgico 3 años	Post quirúrgicos último ⁺	Duración del tratamiento (año.mes)*
1	DFH BDZ AVP	1. CLB (1.7) 2. LVT(85.3) 3. TPM(9.8) 4. MDZ 7.5ml	1. CLB (2.5) 2. LVT (83) 3. TPM (125)	1. CLB (2.3) 2. LVT (75.5) 3. TPM (11.3)	1. AVP (23.9) 2. LVT (60) 3. CLN (0.2)	1. AVP (18) 2. OXC (14) 3. CLN (0.3)	1. OXC (10) 2. AVP (13.7) 3. RPN 1mg/día	3.2
2	DFH (5)	1. LVT (76) 2. TPM (7.6) 3. CLB (0,86) 4. AVP (47) 5. DFH (20)	1. LVT (2 gr/día) 2. TPM (260) 3. CLB(22.5)	1. LVT (1gr/día) 2. TPM (25mg/día) 3. CLB(10mg /día)	1. LVT (116) 2. TPM (12.5) 3. AVP 20mg/kg	1. LVT (80) 2. TPM (6) 3. HRK (8)	1. LVT (63) 2. AVP (17) 3. HRK (4) 4. CLN(0.6)	0.10
3	OXC (180)	1. OXC (180)	1. DFH (7)	1. OXC (15)	1. OXC	1. OXC	Suspendió OXC	1.6
4	AVP	1. DFH (10) 2. TPM (10) 3. VGB (146) 4. PRM (30)	1. DFH (6) 2. TPM (10) 3. CLB (1.5) 4. PRM (30) 5. VGB (146)	1. DFH (14) 2. TPM (12) 3. CLB (2.4) 4. LVT (80)	1. OXC (34) 2. TPM (7.4) 3. CLB (1) 4. LMT (12)	no se puede evaluar.	1. CBZ (0.66) 2. OXC (29) 3. LMT(6.6) 4. TPM (5.3)	Sin dato
5	CBZ	1. LVT 2-0-3 2. DFH 1-3/4-1 3. CLN 1/2 - 1/2 - 1/2	1. DFH 130 mg IV c/8 horas	1. LVT (40) 2. FN (7.5) 3. CLN (0.02)	1. LVT (21) 2. FN (4.3)	1. LVT 2(1gr) - 500 mg - 1 gr. 2. DFH 1 - 3/4 - 1	1. LVT 2(1gr) - 500 mg - 1 gr. 2. DFH 1 - 3/4 - 1,	Sin dato

6	1. AVP	1. AVP	1. FN (15)	1. DFH 4ml-0-4ml	1. DFH 4ml cada 12 hrs	1. Libre de crisis y sin FAE's	1. Libre de crisis y sin FAE's	6.0
7	1. OXC	1. CLB(1.3) 2. TPM (6.8) 3. LMT (13.2) 4. ETX (30) 5. DFH (9)	1. CLB (1.3) 2. TPM 150 mg/día 3. DFH (9) 4. LMT (13.2) 5. HRK (20)	1. CLB 1-1-1 2. TPM 175mg/día 3. ETX 3-3-3	1. CLB (0.6) 2. TPM (8.3) 3. LVT (80) 4. LMT (9.3)	1. CLN 3mg/día 2. AVP 750 mg/día 3. LVT 2 gr/día 4. LMT 300mg/día	1. CLN (0.1) 2. TPM (5) 3. LVT (50) 4. LMT (7.5)	8.4
8	1. OXC (30)	1. LVT (75) 2. FNB (8) 3. LMT (6) 4. ETX (20)	1. LVT (61) 2. CLB (15) 3. AVP 7.5 ml	1. LVT (61) 2. CLB (15) 3. AVP 7.5 ml	1. LVT (60) 2. CLB (7.5) 3. AVP (55)	No evaluable	1. LVT (61) 2. CLB (15) 3. AVP (38)	Sin consignar
P9	1. LVT 2. AVP 3. CLB	1. LVT (80) 2. HRK (8) 3. CLB (1) 4. DFH (7)	1. LVT (80) 2. HRK(8) 3. CLB (1)	1. LVT (66) 2. HRK (7.5) 3. CLB (0.7)	1. LVT (55.5)	No evaluable	1. LVT (55.5)	Sin consignar
10	Sin consignar	Sin consignar	Sin consignar	Sin consignar	Sin consignar	Sin consignar	Sin consignar	Sin consignar

Las dosis están en mg/kg/día excepto las especificadas, N/A: no aplica.*Duración del tratamiento antes de la cirugía, +: último registro en expediente 2015, FAE's; Fármacos antiepilépticos, AVP: Ácido valproico, LVT: Levetiracetam, CLB: Clobazam, LMT: Lamotrigina, CBZ: Carbamazepina, OXC: Oxcarbazepina, TPM: Topiramato, VGT: Vigabatrina, BDZ: Benzodiazepina, DFH: Difenilhidantoina, FN: Fenitoina, HRK: Lacosamida, ETX: Etosuximida, CLN: Clonazepan, PRM: Primidona, RPN: Risperidona, MDZ: Midazolam.

8.7 Cirugía

En el cuadro 8, se resumen los datos relacionados a la cirugía que se realizó en cada paciente. La zona epileptógena del 70% de los pacientes se localizó en el hemisferio cerebral izquierdo y el 30% en el hemisferio cerebral derecho. El foco epiléptico del 60% de los pacientes se localizó en el lóbulo frontal y el 40% de lóbulo temporal. En cuanto al tipo de cirugía practicada, al 40% de los pacientes se les practicó corticectomía, al 30% craneotomía con la resección de la lesión, amigdalocampectomía, hemisferectomía y lobectomía cada una a un 10%.

Cuadro 8. Datos generales de la cirugía de epilepsia

Paciente	Localización (Lóbulo)	Lateralidad (Hemisferio)	Cirugía
1	Frontal	I	Corticectomía frontal izquierda prerolandica.
2	Fronto-central	D	Corticectomía.
3	Temporal	I	Amigdalocampectomía izquierda.
4	Temporal	I	Hemisferectomía funcional izquierda más callosotomía anterior.
5	Frontal-medial	I	Cirugía de epilepsia guiada por estereotaxia, transición subpial múltiple rolandica, prerolandica más corticectomía frontal-medial supracingular.
6	Temporal	D	Craneotomía pterional derecha y resección de la lesión temporal.
7	Frontal	I	Craneotomía frontotemporal izquierda, más lobectomía frontal parcial (F1 y F2) y callosotomía.
8	Frontal	D	Corticectomía frontal derecha con electrocorticografía y neuronavegación (cirugía de epilepsia) resección de tercio medio de F1, F2 y F3.
9	Temporal	I	Craneotomía Fronto temporal izquierda más corticectomía rolandica izquierda y lobectomía temporal supra-izquierda más electrocorticografía transoperatoria.
10	Frontal	I	Lobectomía frontal.

I: Izquierdo, D: Derecho

8.8 Muestras procesadas para el estudio morfológico

Del total de las muestras del foco epiléptico resecado en la cirugía de epilepsia únicamente seis fueron procesadas para el estudio morfométrico: cinco de pacientes pediátricos del INP y uno del HMG, el resto de las muestras no se incluyeron en el estudio debido a que estas no cumplieron con el volumen mínimo requerido para el estudio estereológico. En la figura 13 se presenta un ejemplo de cómo se obtuvo la muestra en la cirugía de epilepsia. En cuanto a las muestras de autopsia, tres fueron proporcionadas por el Instituto de ciencias Forenses y dos por el Instituto Nacional de Pediatría.

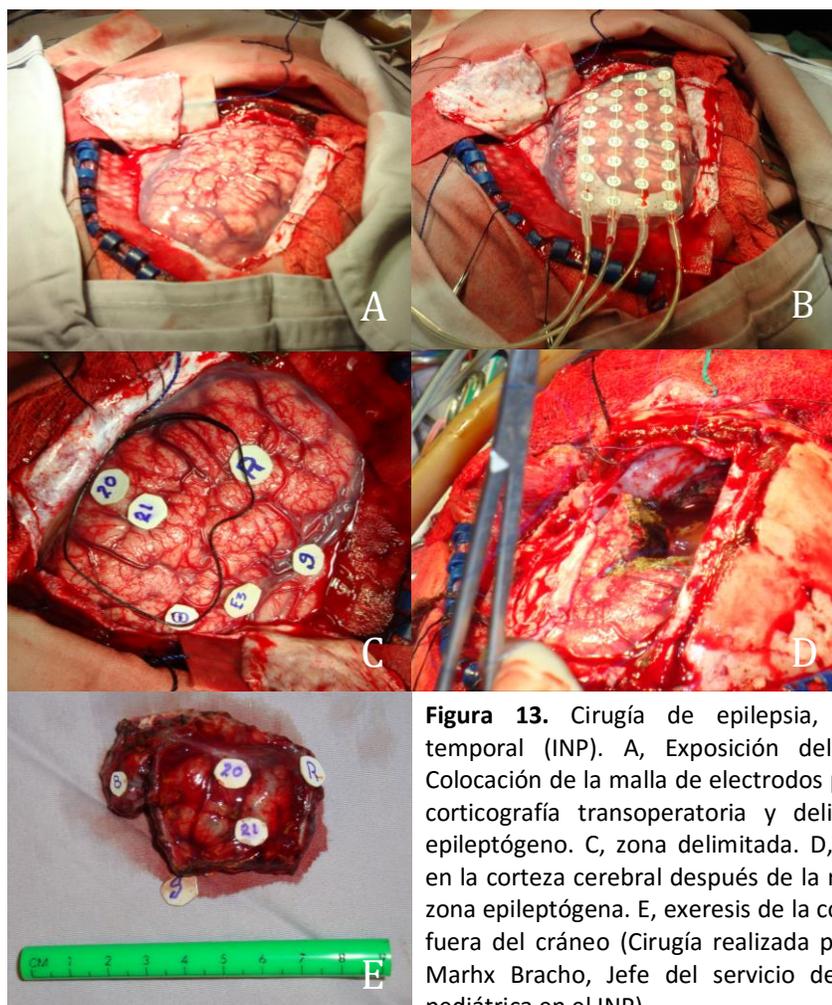


Figura 13. Cirugía de epilepsia, Corticectomía temporal (INP). A, Exposición del encéfalo. B, Colocación de la malla de electrodos para realizar la corticografía transoperatoria y delimitar el foco epileptógeno. C, zona delimitada. D, espacio vacío en la corteza cerebral después de la resección de la zona epileptógena. E, exeresis de la corteza cerebral fuera del cráneo (Cirugía realizada por Dr. Alfonso Marhx Bracho, Jefe del servicio de Neurocirugía pediátrica en el INP).

8.9 Datos clínicos de los pacientes con estudio morfológico

Los pacientes 1, 3, 7, 8, 9 y 10 fueron incluidos en el estudio morfológico. Todos los pacientes fueron diagnosticados con epilepsia de difícil control o resistente a fármacos.

Tres pacientes fueron del sexo femenino y tres del sexo masculino. La edad promedio fue de 7 años 5 meses, con un rango de 4 meses a 13 años.

La duración de la epilepsia fue de 3 años 5 meses en promedio, con un rango de 2 meses a 7 años con 4 meses. Predominaron las crisis parciales en el 66.6% de los pacientes, el 33.3% de los pacientes quedó libre de crisis después de la cirugía y 50 % de los pacientes mejoró, disminuyendo sus crisis en un 90%.

El foco epiléptico predominó en el lóbulo frontal con el 66.6%, seguido del lóbulo temporal con el 44.4% de los pacientes.

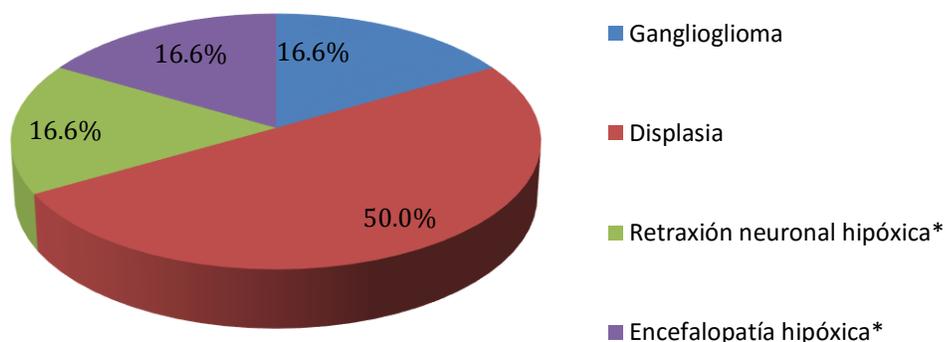


Figura 14. Etiología de los 6 casos incluidos en el estudio morfológico.

* Indica procesos isquémicos.

En cuanto a lateralidad el 66.4% fue de predominio izquierdo, mientras el 44.4% derecho. El diagnóstico patológico indicó que la patología predominante fue la displasia cortical (50%), seguida de procesos isquémicos (33.2%) y un tumor (16.6%), (Fig. 14).

Los exámenes electroencefalográficos (EEG) fueron anormales para todos los pacientes, el 100% de los pacientes presenta actividad paroxística ó epileptiforme antes y después de la cirugía; en los estudios preoperatorios se reportó actividad de base lenta para el 60% de los pacientes mientras que en el postoperatorio el 80% de los pacientes tiene reporte de actividad de base lenta.

Los estudios de resonancia magnética (RMN) se correlacionaron con los electroencefalogramas para la planeación de la cirugía.

8.10 Datos de las autopsias de individuos en edad pediátrica

En el cuadro 9, se resumen los datos clínicos de las 5 muestras de autopsia que se analizaron. La edad promedio fue de 11 años 10 meses con rango de edad de 1 año con 4 meses a 18 años.

El 80% de las autopsias son de género masculino y el 20% femenino. El 40% de los individuos en edad pediátrica falleció por infección respiratoria, el otro 60% falleció debido al impacto de arma de fuego.

El 60% de las muestras de tejido provienen del lóbulo frontal y el 40% restante del lóbulo temporal.

En cuanto a la lateralidad, el 40% es del hemisferio derecho y 30% del izquierdo.

Cuadro 9. Resumen de datos clínicos de las muestras de autopsia.

<i>Autopsia</i>	<i>Género</i>	<i>Edad (años. meses)</i>	<i>Patología</i>	<i>Localización</i>	<i>Lateralidad</i>
1	M	1.4	Neumonía	Temporal	D
2	M	18	Impacto de arma de fuego en región torácica	Temporal	I
3	M	17	Impacto de arma de fuego	Frontal	D
4	M	17	Impacto de arma de fuego	Frontal	I
5	F	6	Neumonía necrosante	Frontal	I

M: masculino, F: femenino, D: derecho, I: izquierdo.

8.11 Estudio morfométrico

8.11.1 Estandarización de los reactivos en tejido cerebral de rata

En el cuadro 10 se observa que la estandarización de los reactivos para la inmunodetección a KCC2 se logró a una concentración del anticuerpo primario de 1:2000 y del anticuerpo secundario a 1:500, mientras que el tiempo de exposición al DAB fue de 2 minutos.

Cuadro 10. Concentraciones de estandarización de los reactivos en tejido cerebral de rata.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Concentración de anticuerpo primario</i>	<i>Concentración de anticuerpo secundario</i>	<i>Tiempo de exposición a DAB [16µl/ml]</i>
KCC2 - rabbit	1:2000	1:500	2 minutos

8.11.2 Estandarización de la inmunodetección contra KCC2 en tejido humano

Una vez probada la eficacia de los anticuerpos y corroborado que hubiera marca en el tejido cerebral de rata, se decidió realizar una prueba de concentraciones del anticuerpo primario KCC2, en tejido de autopsia para obtener neuronas con una tinción nítida. En el cuadro 11 se resumen las concentraciones probadas, y en el cuadro 12 se indican las concentraciones de anticuerpo idóneas que se utilizaron en el análisis, se decidió que se utilizaría la concentración 1:200 debido a que la marca fue prácticamente igual a la de la concentración 1:50, cabe mencionar que el tiempo de exposición a DAB fue menor en el tejido cerebral humano, por lo que todos los tejidos procesados tuvieron una exposición de un minuto con treinta segundos (Fig.15).

Cuadro 11. Pruebas de estandarización en tejido de autopsia

Anticuerpo	Concentración de anticuerpo primario	Concentración de anticuerpo secundario
KCC2 - rabbit	1:50	1:500
KCC2 - rabbit	1:200*	1:500
KCC2 - rabbit	1:2000	1:500

*Concentración idónea, se observa buena marca en las neuronas.

Cuadro 12. Concentración final de anticuerpos y DAB para el proceso por Inmunohistoquímica de tejido humano.

Anticuerpo	Concentración de anticuerpo primario	Concentración de anticuerpo secundario	Tiempo de exposición a DAB [16µl/ml]
KCC2 - rabbit	1:200	1:500	1.5 minutos

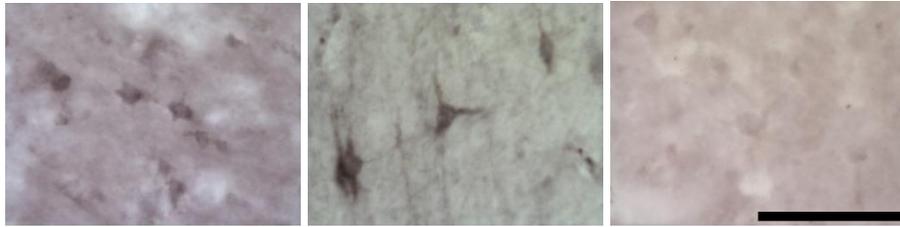


Figura 15. Imágenes de la sustancia blanca de autopsias procesadas con la técnica de inmunodetección para KCC2 a tres concentraciones: A, 1:50; B, 1:200 y C, 1:2000. 60X, Barra= 100 micras.

8.11.3 Cuantificación de células inmunorreactivas a KCC2 en tejido control y paciente.

La estereología es un método en el cual se estima el número de células en un volumen, por medio del conteo sistemático y aleatorio en cortes seriados de una estructura definida (West, 2012). El primer paso para la cuantificación de las células IR-KCC2 es delimitar la zona de interés, en la figura 16 se ejemplifica la delimitación de la zona de estudio (sustancia blanca) en contorno verde, y la materia gris en contorno azul; posterior a la delimitación de la región de interés, se coloca una malla sobre el corte, se calcula la apertura de la malla dependiendo el número de disectores que se requieran para la cuantificación de las células, en este caso la apertura de la cuadrícula fue de 500 μm de alto x 500 μm , de ancho que contenía los sitios de conteo. Dentro de la cuadrícula se encuentran ubicados los disectores. Un disector es un marco de conteo formado por dos secciones, la sección verde que indica que se puede realizar el conteo, incluso si la línea toca o pasa sobre la célula, al contrario de la sección roja, la cual indica que no se deben de contar las células que toque, esto con el propósito de evitar conteos dobles (Fig. 17). La altura del disector es la profundidad del corte que se cuenta. La zona de guarda es el espacio que se descarta en la parte superior e inferior del corte, con esto se eliminan las irregularidades causadas por la navaja al momento del corte.

Los parámetros utilizados para el conteo de células con el método estereológico del disector óptico fueron los siguientes.

- Marco de conteo: 110 x 60 μm
- Altura del disector: 12 μm
- Zona de guarda superior e inferior: 1.5 μm

En cada caso de autopsias y pacientes, el conteo de células se evaluó en 8-10 secciones. Con la ayuda del programa Stereoinvestigator en cada corte de autopsia o foco epiléptico de paciente (Fig. 20). En cada disector se marcaron las células inmunorreactivas a KCC2 de los tres tipos de intensidad: débil, moderado e intenso (Fig.18). Esta dinámica se realizó en todos los cortes, finalmente el programa estadístico del disector óptico integró cada uno de estos datos con diversas fórmulas matemáticas para indicar el número total de células para cada uno de los marcadores.

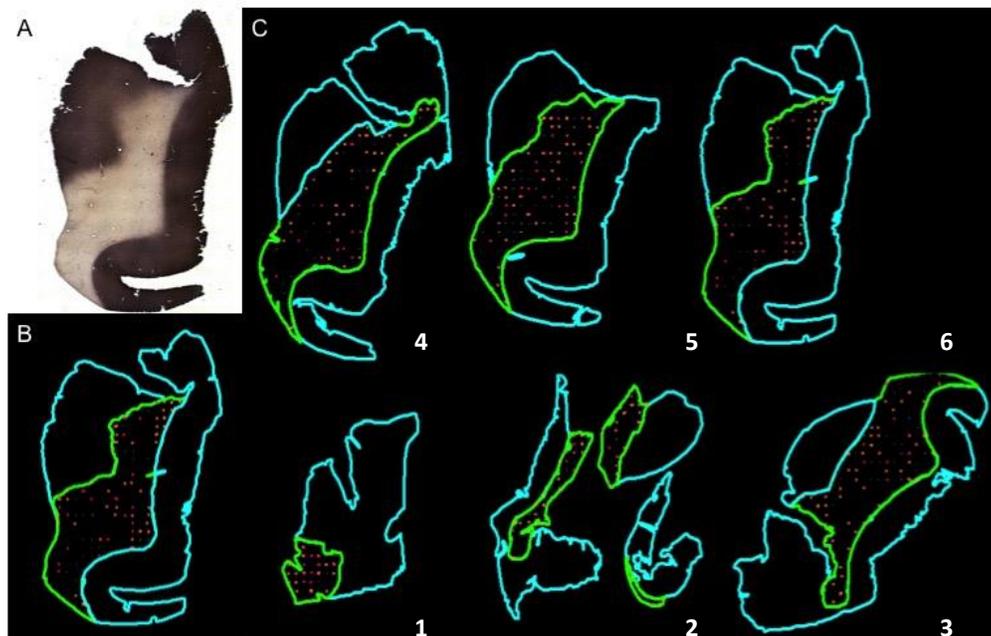


Figura 16. Vista panorámica de las secciones de tejido de un caso de autopsia. En A se muestra la imagen panorámica de un corte tomada con el microscopio óptico a 4X. En B se muestra el mismo corte en el cuál se ha delimitado la sustancia blanca (en verde) de la sustancia gris (en azul), las áreas se dibujan con el programa stereoinvestigator (MBF Bioscience). En C se muestran las 6 secciones utilizadas para el conteo de células.

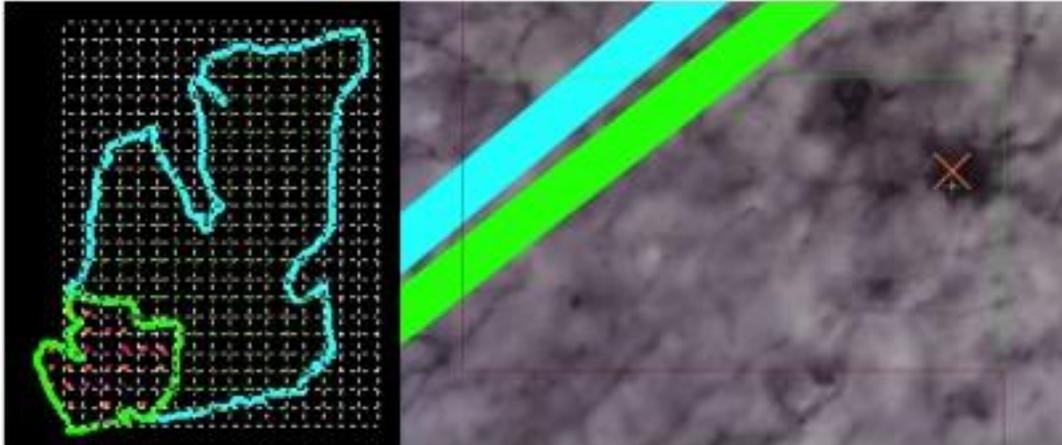


Figura 17. A Malla sobre una sección de tejido, la línea verde delimita la sustancia blanca mientras la línea azul delimita la sustancia gris. B Ampliación de una cuadrícula, el disector se encuentra sobre el límite entre la sustancia gris y la sustancia blanca, con el marcador "X" en color naranja se indica el conteo de una célula.



Figura 18. Acercamiento a células inmunoreactivas a KCC2, el panel A muestra una célula teñida intensamente, el panel B muestra una célula moderadamente teñida, el panel C muestra varias células marcadas con flecha débilmente teñida. Barra = 100 micras.

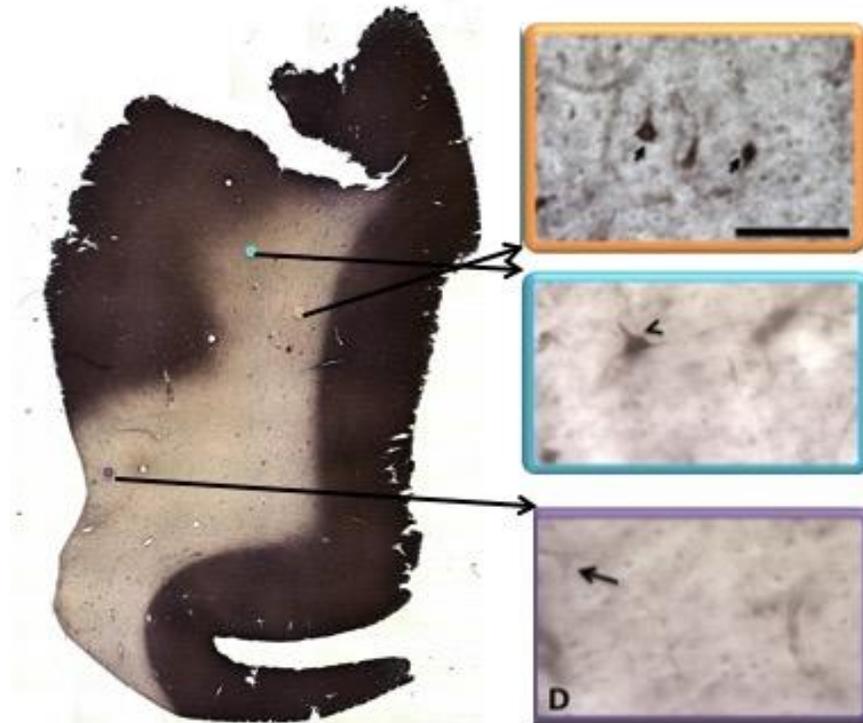


Figura 19. En A vista panorámica de una sección del tejido de autopsia. En B acercamiento a 60X, las flechas indican células intensamente teñidas. En C la cabeza de flecha indica una célula moderadamente teñida. En D la flecha indica célula débilmente teñida. Barra= 100 micras.

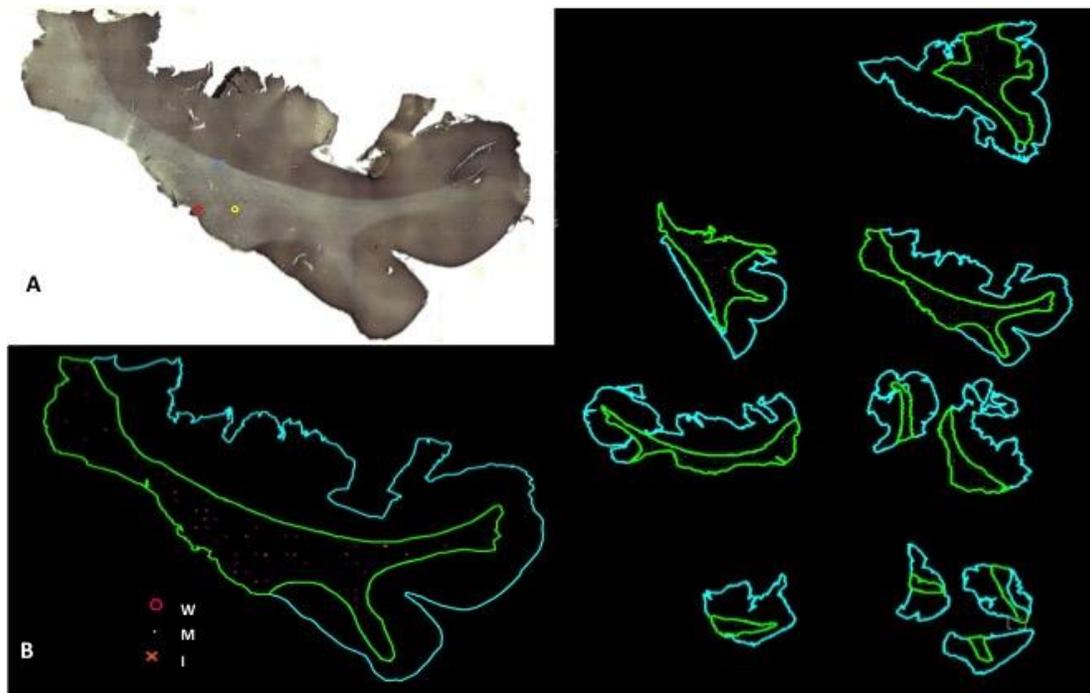


Figura 20. Vista panorámica de una de las secciones del tejido resecado del foco epiléptico. En A sección vista en el microscopio óptico a 4X. B, delimitación de la sustancia blanca (en verde) de la sustancia gris (en azul) dibujado con el programa stereoinvestigador (MBF Bioscience). Los símbolos indican el gradiente de tinción contado W: débil, M: moderado, I: intenso. C, imagen mostrando las 7 secciones donde las células inmunoreactivas a KCC2 fueron contadas.

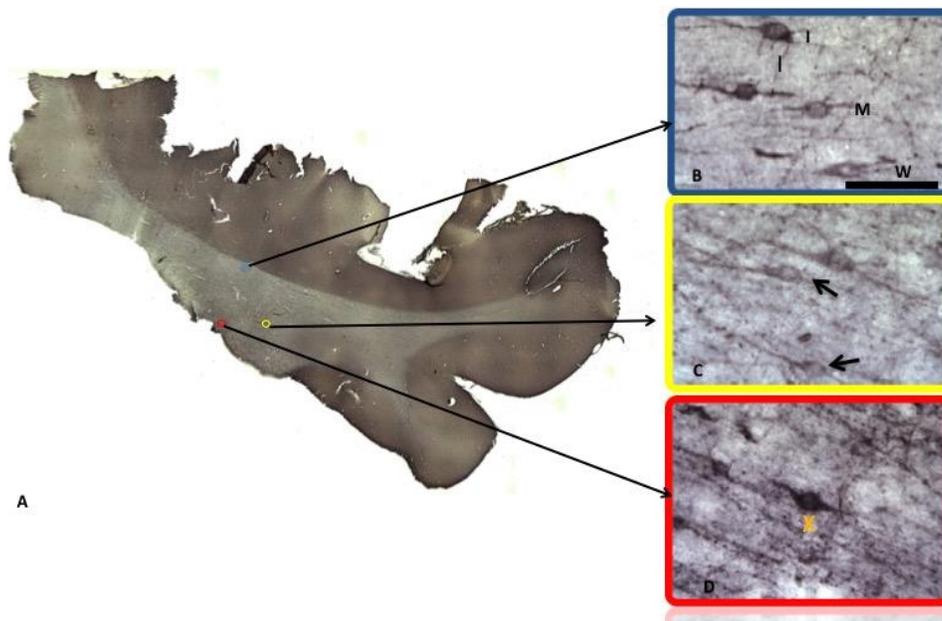


Figura 21. Vista panorámica de un corte de tejido resecado del foco epiléptico, (B) Acercamiento a 60X, donde I: tinción intensa, M: tinción moderada y W: tinción débil. (C) las flechas indican células moderadamente teñidas. (D) célula intensamente teñida indicada con la X. Barra = 100 micras.

Los blancos de la inmunodetección no mostraron células IR-KCC2 cuando se eliminó el anticuerpo primario o secundario (Fig. 22).

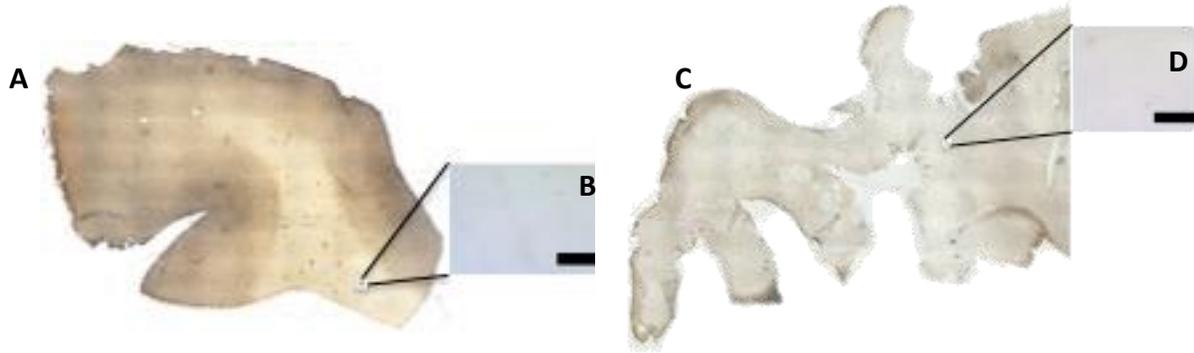


Figura 22. A Vista panorámica de blanco de autopsia; B Acercamiento a 60X de sustancia blanca, no se observan células IR-KCC2. C Vista panorámica de blanco de paciente, D Acercamiento a 60X de sustancia blanca, no se observan células IR-KCC2. Barra=100 micras.

8.11.4 Número de células inmunorreactivas a KCC2 en el grupo con volumen menor a 30 mm³

El cuadro 13 y figura 23, muestran el promedio y desviación estándar del número de células IR-KCC2 en sus tres niveles de tinción celular: débiles, moderadas e intensas de la sustancia blanca de autopsias y del foco epiléptico en el grupo A con un volumen de 30 mm³. Como puede observarse el número de células IR-KCC2 del foco epiléptico fue significativamente menor en comparación con el de autopsias en los tres casos: con tinción celular débil (-50.8%), tinción celular moderada (-63.4%) y con tinción celular intensa (-83.4%). Cuando se analizó el número total de células inmunorreactivas (sumatoria de los tres niveles de tinción), también se observó una reducción significativa respecto de las células totales encontradas en la sustancia blanca de autopsias (-61.9%).

Cuadro 13. Promedio, desviación estándar (D. S.) y valores de las pruebas estadísticas para el no. de células de autopsias y pacientes del grupo A (volumen menor a 30 mm³).

Tipo de tinción	Autopsias		Pacientes		Levene	Valor de T ó U.	Valor de p	Significancia
	Promedio de No. de células	D.S.	Promedio de No. de células	D.S.				
Débil	115,345.96	14,480.90	56.676,10	16.932,01	0.779	t= 3.678	0.035	*
Moderado	197,021.58	16,008.27	72.095,61	5.912,65	0.18	t= 8.361	0.004	**
Intenso	46,524.30	9,863.69	7.682,39	77,41	0.172	t= 4.314	0.023	*
Totales	358,891.84	11,292.91	136.454,09	22.767,25	0.211	t= 14.061	0.001	***

D.S.: Desviación estándar, T: valor de t de Student, U: valor de U de Mann-Whitney.
 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

NÚMERO DE CÉLULAS INMUNORREACTIVAS A KCC2 GRUPO A (30mm³)

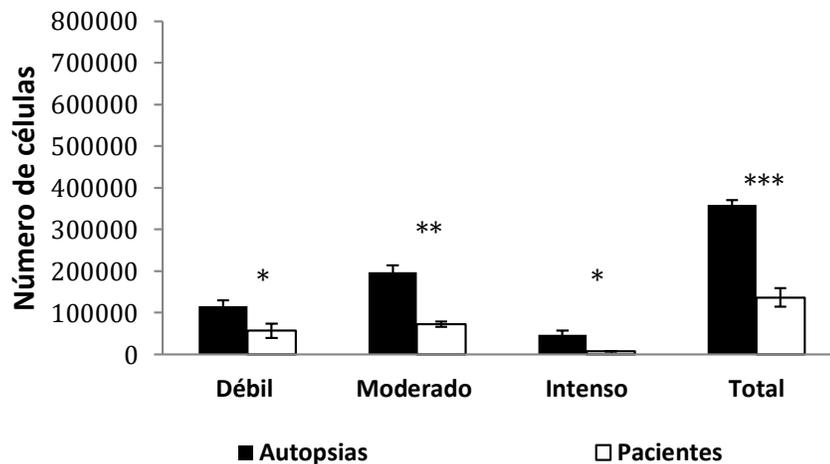


Figura 23. Promedio y desviación estándar de células inmunorreactivas a KCC2 en sustancia blanca del grupo A en todos los niveles de tinción celular. (*p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001).

8.11.5 Número de células inmunorreactivas a KCC2 en el grupo con volumen de 100 mm³.

El cuadro 14 y figura 24, muestran el promedio y desviación estándar del número de células IR-KCC2 débiles, moderadas e intensas, así como el total de las tres en la sustancia blanca de autopsias y del foco epiléptico en el grupo B con un volumen de 100 mm³. En este grupo solo se encontraron diferencias significativas en la tinción moderada y en las células totales; el número de células IR-KCC2 con tinción celular moderada en el foco epiléptico fue 57.1% menor respecto del número de las células encontradas en las muestras de autopsias mientras que el número total de células fue 49.5% menor en los pacientes en comparación con las de autopsias.

Cuadro 14. Promedio, desviación estándar (D. S.) y valores de las pruebas estadísticas para el no. de células de autopsias y pacientes del grupo B (volumen 100 mm³).

Tinción	Autopsias		Pacientes		Levene	Valor de T ó U.	Valor de P	Significancia
	Promedio de No. de células	D.S.	Promedio de No. de células	D.S.				
Débil	151,327.05	56,856.86	94,812.03	13,261.38	0.021	U= 0.000	0.34	-
Moderado	274,529.88	43,752.67	117,673.97	34,543.55	0.695	t= 5.335	0.003	**
Intenso	151,515.11	92,394.86	78,790.41	22,338.91	0.061	t= 1.562	0.179	-
Totales	577,372.05	89,977.65	291,276.41	40,241.22	0.169	t= 5.773	0.002	**

D.S.: Desviación estándar, T: valor de t de Student, U: valor de U de Mann-Whitney.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

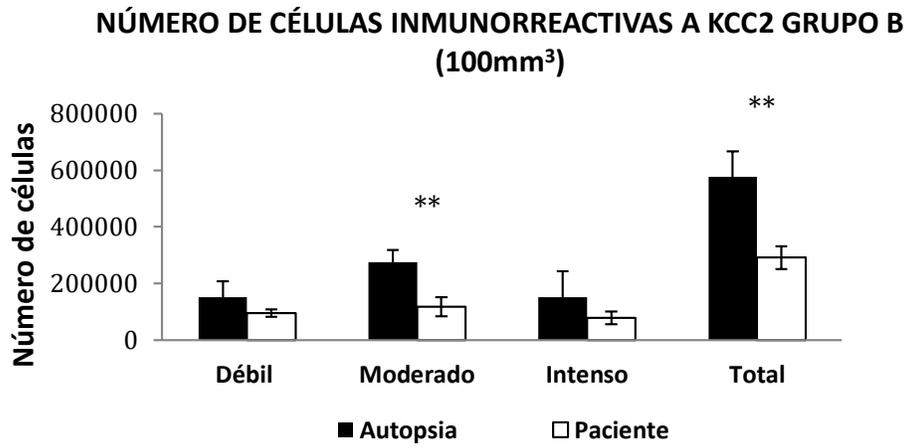


Figura 24. Promedio y desviación estándar de células inmunorreactivas a KCC2 en sustancia blanca del grupo B (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

10. Discusión

En el presente estudio se investigó la expresión de la proteína de membrana KCC2 encargada de la extrusión de cloruro de la neurona, en la sustancia blanca del foco epiléptico resecado de pacientes con epilepsia refractaria a medicamentos.

El principal hallazgo fue la disminución significativa del número de células inmunorreactivas a KCC2 en la sustancia blanca del foco epiléptico de pacientes con epilepsia de difícil control comparados con las cuantificadas en el tejido de autopsia (control).

Actualmente no existen estudios comparativos, cuantitativos o estereológicos que cuantifiquen el número de células IR-KCC2 en la sustancia blanca del foco epiléptico de pacientes pediátricos, por lo que este sería el primer trabajo que abordó este tema, sentando un precedente para futuros estudios.

Los estudios previos de la expresión del cotransportador KCC2 en el tejido proveniente de autopsias considerado como tejido control reportan poca o nula inmunorreactividad en la sustancia blanca. Munakata y colaboradores (2007), estudiaron la sustancia blanca cerebral de autopsias de humano reportando la existencia de pocas células subcorticales IR- KCC2. Aronica y colaboradores (2007) indicaron una nula inmunorreactividad de KCC2 en la sustancia blanca de autopsia. En nuestro estudio se observó una gran cantidad de células IR-KCC2 con diferente tipo de tinción en toda la sustancia blanca control. Esta diferencia tan grande puede ser debida a que los autores antes mencionados analizaron únicamente de 1-3 campos en 1-3 cortes con un grosor de 3-8 micras, en tanto que en el presente trabajo la cuantificación de las células IR-KCC2 se llevó a cabo con el método del fraccionador óptico, un método de análisis estereológico que toma en cuenta el volumen total de una estructura (campos tridimensionales), y no solamente de uno a tres campos bidimensionales de ella, disminuyendo así errores en el conteo de células.

Si bien existen trabajos previos donde se estudió la expresión del cotransportador KCC2 en el foco epiléptico, éstos se enfocaron en el análisis únicamente de la corteza cerebral o sustancia gris. Estos estudios son cualitativos, y las discrepancias entre ellos pueden ser debido a las diferentes técnicas utilizadas por los investigadores, por ejemplo: diferente grosor de los cortes, tipo de análisis, inclusión de pacientes adultos y pediátricos, nulo pareamiento entre las muestras controles y las de cirugía en cuanto a la región anatómica cerebral y análisis morfométrico basado únicamente en 1 a 3 cortes de toda la zona epileptogénica, entre otros.

Al comparar nuestro resultado con estudios en tejido no epiléptico observamos resultados semejantes. Robinson y colaboradores en el 2010 reportaron disminución de células IR-KCC2 en sustancia blanca de pacientes pediátricos pretérmino con leucoencefalopatía.

En este trabajo se llevó a cabo el conteo de las células IR-KCC2 discriminándolas en tres grupos, determinados por una escala de intensidad de tinción: débil, moderada e intensa; determinando en base a estudios semicuantitativos enfocados a la sustancia gris, los cuales reportan que la intensidad de la tinción depende de la madurez de la célula y de la patología del tejido estudiado (Aronica y cols., 2007); en la displasia cortical se ha reportado que las neuronas pequeñas que se encuentran junto a neuronas gigantes tienen una menor expresión del cotransportador KCC2, mientras que las neuronas gigantes tienen una expresión similar a la de neuronas en tejido sano (Shimizu-Okabe y cols., 2011), donde una neurona inmadura es aquella con tinción intrasomática, y una célula madura la que tenga tinción de membrana (Aronica y cols., 2007), la inmunotinción contra KCC2 también se observa en el neuropilo (Li y cols., 2007).

En el grupo A 30mm^3 existe una diferencia significativa en todos los grupos indicando la reducción de la expresión de las células maduras e inmaduras en todos los grupos. En el grupo B 100mm^3 , solo existe diferencia en el grupo moderado que por su tinción se tomaría como célula inmadura,

lo cual indica que la diferencia en las células totales es debido a la disminución de la expresión de las células inmaduras.

En base a los resultados obtenidos en ambos grupos las neuronas más abundantes y con diferencias significativas ($p \leq 0.01$) fueron las que presentaron inmunorreactividad moderada, que en base a las clasificaciones propuestas por Aronica y cols., (2007) estas neuronas con tinción intrasomática se encuentran inmaduras, corroborando así que el tejido reseca de los pacientes epilépticos actúa como una central de tejido inmaduro, lo cual provoca una cadena de señales paroxísticas induciendo al sistema a generar crisis epilépticas. Se puede observar que existen diferencias significativas entre los pacientes y las autopsias en los 3 tipos de tinción y las células totales del grupo 'A', a diferencia del grupo 'B' que solo tiene diferencia significativa en la tinción moderada y el número total de células, en el conteo total la diferencia entre autopsias y pacientes es significativamente diferente ($p \leq 0.01$) corroborando la desregulación del cotransportador en el tejido epiléptico (Mateos-Beato, 1999; Aronica y cols., 2007; Conti y cols., 2011).

Los resultados indican una disminución de la expresión del cotransportador KCC2, por lo que, se puede inferir que las neuronas actúan al igual que en la etapa inmadura, al existir una menor expresión del cotransportador que extrae el cloruro, la concentración intracelular del ion aumenta, generando la despolarización de la membrana propiciando la acción excitadora de GABA, generando una región hiperexcitable (Ben Ari, 2002; Aronica y cols., 2007). Esta región genera actividad paroxística de un área cerebral determinada (foco epileptógeno). De esto la importancia del estudio del tejido afectado y la evolución del paciente; si bien los modelos de epilepsia permiten dilucidar las bases de los mecanismos y probar la efectividad de los medicamentos, estos se encuentran controlados y por ende limitados en cuanto a la influencia de factores externos, a los que los pacientes se encuentran sometidos, como la constante regulación

y cambio de medicamentos tanto para el control de las crisis epilépticas, como para enfermedades concomitantes y comorbilidades, debido a la etapa de desarrollo en la que se encuentran, el estado nutricional, las actividades físicas de los pacientes, entre otros; la unión de todos los factores anteriores pueden permitir el mejoramiento de los tratamientos adecuado a cada individuo con la finalidad de favorecer el control de las crisis epilépticas derivadas de su padecimiento.

Recientemente se ha propuesto al cotransportador KCC2 como blanco terapéutico para posibles fármacos antiepilépticos, que lo activen sin alterar sus otras funciones (Puskarjov y cols., 2014). En específico se ha considerado como blanco farmacológico para la concentración neuronal de cloro, y consecuentemente de la respuesta GABAérgica. Sin embargo se debe tomar en cuenta que el cotransportador KCC2 no solo participa en el transporte iónico para mantener la homeostasis del cloro, también es una proteína estructural, por lo que tiene una función importante en la formación, maduración y función de las espinas dendríticas (Li y cols., 2007; Llano y cols., 2015). Las espinas dendríticas son la parte postsináptica de las sinapsis por lo que la alteración en su número, estructura o función probablemente repercutirá en la comunicación neuronal. Una posible elevación de los niveles de la proteína KCC2, por ejemplo, con terapia génica, podría no ser una estrategia útil, en tanto que aumentar la actividad en la función de transporte de KCC2 es más relevante desde el punto de vista terapéutico (Puskarjov y cols., 2014), para esto se requieren más estudios de los reguladores del cotransportador, como la neuroligina-2, el cual es una molécula de adhesión encontrada en las sinapsis GABAérgicas (Sun y cols., 2013).

Actualmente se sabe que la disminución de la expresión del cotransportador por el antagonista VU0240551 también puede reducir la acción inhibitoria, facilitando las crisis epilépticas (Deisz y cols., 2014), agonistas como el A3AR (Ford y cols., 2015) y el CLP257 (Gagnon y cols., 2013) se han

estudiado como posibles inhibidores de dolor neuropático, ambos son altamente afines a KCC2, sin embargo, siguen afectando a todo el sistema nervioso.

Según las estadísticas, 40% de los pacientes epilépticos padecen epilepsia de difícil control, de los cuales el 10% son candidatos a estudios prequirúrgicos (Kanner y Campos, 2004). Los reportes de instituciones internacionales indican que en promedio se realizan 47 cirugías resectivas al año (Cukiert y cols., 2016), sin embargo, en este estudio se reclutaron 11 pacientes con cirugía de epilepsia en el Instituto Nacional de Pediatría en un periodo de 4 años, de los cuales, solo 9 pacientes cumplieron con los criterios de inclusión, posteriormente se realizó el estudio morfométrico únicamente a 6 ya que el volumen final del tejido no fue suficiente.

Es importante mencionar que son pocos pacientes pediátricos sometidos a cirugía de epilepsia comparado con otras instituciones nacionales e internacionales, esto se debe a que existe una alta demanda del servicio de neurocirugía y pocos recursos para llevar a cabo la cirugía de epilepsia; algunas de las probables causas del bajo número de cirugías realizadas son el alto costo de insumos como las mallas de electrodos necesarias para realizar la corticografía transoperatoria además este tipo de cirugía se desarrolla en tiempos largos por lo que solo es posible una intervención al día, entre otros. Los pacientes son referidos al instituto por otras instituciones de salud, una tercera parte de las consultas en el INP son atendidas por el servicio de neurología. La presencia de crisis y epilepsia son las razones más frecuentes de las consultas del servicio de neurología.

Es probable que por el tamaño de la muestra el género femenino (60%) haya predominado en el presente trabajo; en otro estudio realizado durante el periodo de 2010 a 2012 en el Instituto Nacional de Pediatría en pacientes con diagnóstico de epilepsia parcial, el porcentaje de género femenino (52.2%) fue muy similar al masculino (47.8%) (Sanchez y cols., 2014). Por el contrario, en

los estudios de Ruiz-García y cols., (2002) y Eriksson y Koiviko (1997) el género predominante fue el masculino.

La edad promedio del inicio de la epilepsia de los pacientes fue de 8.5 años mientras que en el estudio de Ruiz-García y cols., (2002), fue de 5 años con 6 meses; la duración promedio de la epilepsia hasta el momento de la cirugía fue de 4 años con 6 meses, similar a los 3 años 5 meses reportados en el grupo de epilepsia sintomática (Ruiz-García y cols., 2002).

La epilepsia parcial predominó en el 60% de los casos, en cuanto al diagnóstico patológico de la epilepsia, predominaron los cambios hipóxicos con el 40%, seguido por la displasia cortical con el 20% y ganglioglioma con el 20% y finalmente inflamación con el 10%; el predominio de las alteraciones hipóxicas concuerdan con los datos reportados en el estudio de Ruiz-García y cols., (2002).

En cuanto a la etiología, el 90% fue epilepsia sintomática y el 10% criptogénica; estos datos se asemejan a lo reportado en el estudio de Ruiz-García y cols., (2002), donde la epilepsia sintomática predominó con el 64.5% mientras que el 18.4% de los pacientes manifestó epilepsia criptogénica y el 17.1% epilepsia idiopática. Con estos datos se corroboró que la epilepsia sintomática predomina debido a la existencia de un cambio anatómico en la estructura encefálica.

Aunque es una muestra pequeña los datos sobre la etiología sintomática, son similares a los reportados por Sánchez y colaboradores (2014) en el perfil clínico y farmacoterapéutico del INP.

Como ya se sabe las epilepsias de lóbulo frontal y temporal están caracterizadas por crisis parciales simples, parciales complejas, crisis secundariamente generalizadas ó una combinación de las anteriores (Wyllie y cols., 2011); siguiendo este patrón, en esta muestra predominaron las crisis parciales pre y postquirúrgicamente.

Después de que cada paciente fue estudiado e intervenido quirúrgicamente por un grupo interdisciplinario de médicos, estos mostraron una mejoría en el control de las crisis confirmando al igual que Reinholdson y cols., (2015), Teutonico y cols., (2013) y Jayalakshmi y cols., (2011) que un adecuado diagnóstico, localización y resección de la región afectada, permite erradicar o disminuir las crisis, mejorando la calidad de vida del paciente. La mejoría en el control de las crisis supone un éxito al procedimiento, ya que la mayoría de los pacientes tienen un padecimiento de base que genera daño *per se*; en este estudio no se contempló la clasificación de Engels (Wieser y cols., 2001), debido a que no se encontró el dato reportado en los expedientes.

Aunque todos los pacientes tuvieron una mejora en el control de las crisis, se puede resaltar que los pacientes con epilepsia de lóbulo temporal o relacionado a alguna lesión, en este caso tumoración y displasia cortical tuvieron una mejor evolución clínica, de los cuatro pacientes con cirugía de lóbulo temporal, tres remitieron las crisis y uno mejoró su control al igual que lo reportado por Jayalakshmi y cols., (2011). Los pacientes con cirugía de lóbulo frontal disminuyeron el número de crisis, pero ninguno quedó libre de estas.

Es importante mencionar que el 90% de estos corresponden al grupo con etiología sintomática por lo que los resultados se compararan principalmente con el grupo sintomático del estudio de Ruiz-García y cols., (2002). El 20% de los pacientes de este estudio fueron manejados con monoterapia mientras que el 70% restantes se trataron con polifarmacia, a diferencia de lo reportado por Ruiz-García y cols., (2002) y Sanchez y cols., (2014) en los cuáles la monoterapia es el tratamiento más implementado.

Según el reporte de García y cols., (2002) el medicamento tanto en monoterapia, como en terapia de dos fármacos más frecuente fue el ácido valproico, por ser más accesible económicamente; sin embargo, en esta muestra se encontró que el 50%, fue tratado con levetiracetam y

difenilhidantoina prequirurgicamente; el levetiracetam representa uno de los fármacos antiepilépticos más utilizados por sus beneficios debido a su mecanismo de acción, el cuál es unirse a la vesícula sináptica SV2A, propicia el decremento inespecífico de la neurotransmisión cuando existe un estado de hiperactivación neuronal, por lo mismo tiene un amplio espectro de control de las crisis, no tiene interacciones farmacocinéticas importantes y su metabolismo no es hepático (Abou-Khalil, 2016). Por su parte la DFH es un fármaco que ejerce un efecto estabilizador sobre las membranas excitables de las células; reduce los flujos de reposo de Na^+ y la despolarización, es el tratamiento base para convulsiones tónico-clónicas, parciales, simples y complejas de lóbulo temporal, indicado para el control de las crisis durante y después de la neurocirugía, tiene interacciones farmacológicas, es de lenta absorción y de metabolismo hepático (Vademécum, 2014).

En el periodo de 1 mes a 1 año postquirúrgicos, el fármaco más utilizado después del levetiracetam fue el topiramato, el cual tiene diferentes mecanismos de acción entre los que destacan el bloqueo tiempo-dependiente de los potenciales de acción repetitivos inducidos por despolarización sostenida de las neuronas (posiblemente por inhibición de los canales del sodio), el incremento del ingreso de cloro a la neurona mediado por el GABA, y el antagonismo de la acción activadora del kainato sobre el receptor excitatorio del ácido glutámico (Vademécum, 2014), es un antiepiléptico de amplio espectro efectivo contra las crisis tónico-clónicas focales y generalizadas.

La dosis y fármacos, fueron dependientes de la evolución del control de las crisis de cada paciente, estos se ajustaron al peso y niveles séricos del fármaco.

Dado que el INP es una institución de salud de tercer nivel, y que los pacientes de esta muestra son de difícil control y de distintos estratos económicos, los medicamentos que se utilizaron

durante el tratamiento pre y post quirúrgico se ajustaron en dosis y terapia según la evolución clínica y el poder adquisitivo de la familia para seguir el apego al tratamiento.

El examen de resonancia magnética es una herramienta útil para detectar el foco epileptico siempre y cuando exista una alteración visible de la anatomía encefálica, como la displasia cortical que predominó en el 20% de los pacientes. En cuanto al estudio de electroencefalografía, este resulta útil para corroborar de manera más específica la región; en conjunto estos estudios preoperatorios permiten la definición previa de la región, para que la electrocorticografía intraoperatoria delimite de manera específica la región que se reseca (Kumar y cols., 2013).

Se ha reportado que la región más afectada en pacientes adultos es el lóbulo temporal por esclerosis hipocámpal (Volcy-Gómez, 2004). A diferencia de los adultos, la región afectada con mayor frecuencia en los pacientes pediátricos de nuestra muestra fue el lóbulo frontal, es posible que esto se deba a que la esclerosis es un proceso crónico degenerativo que se expresa de manera aguda en la etapa adulta, en cambio en los pacientes pediátricos predominaron cambios anatómicos como displasia y tumoraciones.

Las alteraciones en el lóbulo frontal fueron predominantes en las muestras, lo que difiere de lo reportado por Andresen y cols., (2014) donde de cien casos descritos de epilepsia el 36% fue frontal y el 64% temporal, posiblemente esto sea consecuencia del pequeño número de casos reclutados para el estudio.

La cirugía predominante fue la corticectomía, debido a que en la corteza se encontró el foco epileptógeno, cabe destacar que en caso de ser localizado más de un foco epileptógeno (crisis generalizadas) la cirugía aplicada fue la callosotomía mejorando el control de las crisis, de acuerdo a Liang y cols., (2015).

11. Conclusiones

- El número de células inmunorreactivas al cotransportador KCC2 es menor en la sustancia blanca del foco epiléptico de pacientes con epilepsia de difícil control en comparación con las cuantificadas en autopsias.
- La disminución de la expresión del cotransportador KCC2 encontrada en el tejido epileptógeno resecado en la cirugía de epilepsia, refleja un funcionamiento celular similar al manifestado en estado de inmadurez.
- La disminución de la expresión del cotransportador KCC2, principal extractor de cloruro, aumenta la concentración intracelular de este ion, contribuyendo así al efecto excitador del neurotransmisor GABA, lo que explicaría en parte el aumento de excitabilidad reportado en el del foco epiléptico resecado en la cirugía de epilepsia.
- Actualmente no existen estudios comparativos, cuantitativos ó estereológicos que cuantifiquen el número de células IR-KCC2 en la sustancia blanca del foco epiléptico de pacientes pediátricos, por lo que este es el primer trabajo que abordo este tema, sentando un precedente para futuros estudios.
- Este trabajo puede ser tomado como referencia para futuras investigaciones de biomarcadores indicadores de epilepsia refractaria, así como para estudios más detallados que busquen nuevos blancos terapéuticos y fármacos.

12. Referencias

- Abou-Khalil BW. Antiepileptic drugs. *Continuum*. 2016;22:132–156.
- Akiyama K, Miyashita T, Mori T, Mori N. Expression of the Na⁺–K⁺–2Cl⁻ cotransporter in the rat endolymphatic sac. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;364:913–917.
- Andresen EN, Ramirez MJ, Kim KH, Dorfman AB, Haut JS, Klaas PA, Jehi LE, Shea K, Bingaman WE, Busch RM. Effects of surgical side and site on mood and behavior outcome in children with pharmaco-resistant epilepsy. *Frontiers in Neurology*. 2014;19:5-18.
- Aronica E, Boer K, Redeker S, Spliet WG, Van Rijen PC, Troost D, Gorter JA. Differential expression patterns of chloride transports, Na⁺- K⁺- 2Cl⁻-cotransporter and K⁺-Cl⁻-cotransporter, in epilepsy-associated malformations of cortical development. *Neuroscience*. 2007;145:185-196.
- Banerjee PN, Filippi D, Allen Hauser W. The descriptive epidemiology of epilepsy a review. *Epilepsy Research*. 2009;85:31-45.
- Ben-Ari Y. Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience*. 2002;3:728-739.
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, Van Emde BW, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia*. 2010;51:676–685.
- Cellot G, Cherubini E. Functional role of ambient GABA in refining neuronal circuits early in postnatal development. *Frontiers in neural circuits*. 2013;136:1-9.
- Cepeda C, André VM, Livine MS, Salomón N, Miyata H, Vinters HV, Mathern GW. Epileptogenesis in pediatric cortical dysplasia: the dysmature cerebral developmental hypothesis. *Epilepsy Behavior*. 2006;9:219-235.
- Chamma I, Chevy Q, Poncer JC, Lévi S. Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2012;6:1-15.
- Conti L, Palma E, Roseti C, Lauro C, Cipriani R, de Groot M, Aronica E, Limatola C. Anomalous levels of Cl⁻ transporters cause a decrease of GABAergic inhibition in human peritumoral epileptic cortex. *Epilepsia*. 2011;52:1635-1644.
- Cossart R, Christophe B, Ben-Ari Y. Multiple facets of gabaergic neurons and synapses: multiple facets of GABA signaling in epilepsies. *Neuroscience*. 2005;28:108-115.
- Cukiert A, Rydenhag B, Harkness W, Cross JH, Gaillard WD. Technical aspects of pediatric epilepsy surgery: Report of a multicenter, multinational web-based survey by the ILAE Task Force on Pediatric Epilepsy Surgery. *Epilepsia*. 2016;57:194-200.

- Deisz RA, Wierschke S, Schneider UC, Dehnicke C. Effects of VU0240551, a novel KCC2 antagonist, and DIDS on chloride homeostasis of neocortical neurons from rats and humans. *Neuroscience*. 2014;277:831-41.
- Eriksson KJ, Koivikko MJ. Prevalence classification and severity of epilepsy and epileptic syndromes in children. *Epilepsia*. 1997;38:1275-1282.
- Fatterpekar GM, Naidich TP, Delman BN, Aguinaldo JG, Gultekin SH, Sherwood CC, Hof PR, Drayer BP, Fayad ZA. Cytoarchitecture of the human cerebral cortex: MR microscopy of excised specimens at 9.4 Tesla. *AJNR Am J Neuroradiology* 2002;23:1313-1321.
- Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J Jr, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55:475-482.
- Flemmer AW, Giménez I, Dowd B, Darman R, Forbush B. Activation of the Na-K-Cl cotransporter NKCC1 detected with a phospho-specific antibody, *JBC Papers in Press*. 2002;277:37551–37558.
- Ford A, Castonguay A, Cottet M, Little JW, Chen Z, Symons-Liguori AM, Doyle T, Egan TM, Vanderah TW, De Koninck Y, Tosh DK, Jacobson K, Salvemini D. Engagement of the GABA to KCC2 signaling pathway contributes to the analgesic effects of A3AR agonists in neuropathic pain. *Journal of Neuroscience*. 2015;35:6057-67.
- Gagnon M, Bergeron M, Lavertu G, Castonguay A, Tripathy S, Bonin RP, Perez-Sanchez J, Boudreau D, Wang B, Dumas L, Valade I, Bachand K, Jacob-Wagner M, Tardif C, Kianicka I, Isenring P, Attardo G, Coull JA, De Koninck Y. Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases. *Nature Medicine*. 2013;19:1524-8.
- Gastaut H. Diccionario de epilepsia. WHO Working Group on the Dictionary of Epilepsy, 1973.
- Gomez-Lira G, Mendoza-Torreblanca JG, Granados-Rojas L. Ketogenic diet does not change NKCC1 and KCC2 expression in rat hippocampus. *Epilepsy Research*. 2011;96:166-171.
- Hübner CA. The KCl-cotransporter KCC2 linked to epilepsy, *EMBO reports*. 2014;15:732-733.
- Hübner CA, Lorke DE, Hermans-Borgmeyer I. Expression of the Na-K-2Cl-cotransporter NKCC1 during mouse development. *Mechanisms of Development*. 2001; 102:267-269.
- International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*. 1981;22:489-501.
- International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*. 1989;30:389-99.

- Jayalakshmi S, Panigrahi M, Kulkarni DK, Uppin M, Somayajula S, Challa S. Outcome of epilepsy surgery in children after evaluation with non-invasive protocol. *Neurology India*. 2011;59:30-36. Doi: 10.4103/0028-3886.76854.
- Kahle KT, Staley KJ, Nahed BV, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, Mount DB. Roles of the cationchloride cotransporters in neurological disease. *Nature Clinical Practice Neurology*. 2008;4:490-503.
- Kahle KT, Rinehart J, Lifton RP, Phosphoregulation of the Na-K-2Cl and K-Cl cotransporters by the WNK kinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010. 1802:1150–1158.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, *Principios de neurociencia*. Cuarta edición, España, Interamericana, 2001.
- Kanner AM, Campos MG; capítulo 40 *Evaluación prequirúrgica en Epilepsias diagnóstico y tratamiento*. Chile. Mediterraneo 2004 p. 574- 596.
- Kerfoot C, Vinters HV, Mathern GW. Cerebral cortical dysplasia: giant neurons show potential for increased excitation and axonal plasticity. *Developmental Neuroscience*. 1999;21:260–270.
- Kumar A, Valentín A, Humayon D, Longbottom AL, Jimenez-Jimenez D, Mullatti N, Elwes RCD, Bodi I, Honavar M, Jarosz J, Selway RP, Polkey CE, Malik I, Alarcón G. Preoperative estimation of seizure control after resective surgery for the treatment of epilepsy. *Seizure*. 2013;22:818-826.
- Lesson T, Lesson CR, Paparo AA, *Texto/Atlas de Histología*. Primera edición, México, Interamericana, 1990.
- Li H, Khirug S, Cai C, Ludwig A, Blaesse P, Kolikova J, Afzalov R, Coleman SK, Lauri S, Airaksinen MS, Keinänen K, Khiroug L, Saarma M, Kaila K, Rivera C. KCC2 interacts with the dendritic cytoskeleton to promote spine development. *Neuron*. 2007;56:1019-33.
- Liang C, Tang Y, Mu H, Guo T, Du Y, Yue X, Li W, Zhao W. Corpus Callosotomy for Patients With Intractable Seizures: An Insight Into the Rapid Relapse. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2015;26:795-8.
- Llano O, Smirnov S, Soni S, Golubtsov A, Guillemín I, Hotulainen P, Medina I, Nothwang HG, Rivera C, Ludwig A. KCC2 regulates actin dynamics in dendritic spines via interaction with β -PIX. *Journal Cell Biology*. 2015;209:671-86.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*. 2007;114:97-109.
- Mateos-Beato F. Epilepsia y malformaciones del SNC. *Revista de Neurología*. 1999;28:136-140.

- Medina I, Friedel P, Rivera C, Kahle KT, Kourdougli N, Uvarov P, Pellegrino C. Current view on the functional regulation of the neuronal K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014;8:1-18.
- Munakata M, Watanabe M, Otsuki T, Nakama H, Arima K, Itoh M, Nabekura J, Linuma K, Tsuchiya S. Altered distribution of KCC2 in cortical dysplasia in patients with intractable epilepsy. *Epilepsia*. 2007;48:837-44.
- Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neuroscience*. 2003;26:199–206.
- Pinel JPJ. *Biopsicología*. Sexta edición, Madrid, Pearson, 2007.
- Puskarjov M, Kahle KT, Ruusuvuori E, Kaila K. Pharmacotherapeutic targeting of cation-chloride cotransporters in neonatal seizures. *Epilepsia*. 2014;55:806–818.
- Reinholdson J, Olsson I, Edelvik A, Hallböök T, Lundgren J, Rydenhag B, Malmgren K. Long-term follow-up after epilepsy surgery in infancy and early childhood a prospective population based observational study. *Seizure*. 2015;30:83-9.
- Robinson S, Mikolaenko I, Thompson I, Cohen ML, Goyal M. Loss of Cation-Chloride cotransporter expression in preterm infants with white matter lesions: implications for the pathogenesis of epilepsy. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2010;69:565-572.
- Ruiz-García M, Sosa-de-Martinez C, González-Astiazarán A, Rueda-Franco F. Clinical-etiological and therapeutic profile of 719 Mexican epileptic children. *Child's Nervous System*. 2002;18:593-598.
- Rufo CM. Cuando considerar una epilepsia refractaria. *Revista del grupo de epilepsia de la sociedad española de neurología*. 2009;1:10-13.
- Ryvlin P, Rheims S. Epilepsy surgery: eligibility criteria and presurgical evaluation. *Dialogues Clin Neurosciences*. 2008;10:91-103.
- Sánchez-Álvarez JC, Serrano-Castro P, Cañadillas-Hidalgo F, Refractory epilepsy in adults. *Revista de Neurología*. 2002;35:931-53.
- Sánchez Sánchez O, Ruiz-García M, Polanco Melo YC, Ortega Setién D, Aguilar-Quintana A, González García MC, Trujillo Jiménez F, Carmona Aparicio L. Perfil clínico y fármaco-terapéutico de la población con epilepsia parcial en edad pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría. *Acta Universitaria*. 2014; 24:80-86.
- Shimizu-Okabe C, Tanaka M, Matsuda K, Mihara T, Okabe A, Sato K, Inoue Y, Fujiwara T, Yagi K, Fukuda A. KCC2 was downregulated in small neurons localized in epileptogenic human focal cortical dysplasia. *Epilepsy Research*. 2011;93:177-84.
- Sun C, Zhang L, Chen G. An unexpected role of neuroligin-2 in regulating KCC2 and GABA functional switch. *Molecular Brain*. 2013;6:23.

- Teutonico F, Mai R, Veggiotti P, Francione S, Tassi L, Borrelli P, Balottin U, LoRusso G. Epilepsy surgery in children: Evaluation of seizure outcome and predictive elements. *Epilepsia*. 2013;54:70-6.
- Tortora G. J., Derrickson B. H., *Principles of Anatomy and Physiology*. 14th Edition, EUA, Wiley, 2013.
- Treviño M, Gutiérrez R. Las bases celulares de las oscilaciones neuronales. *Salud Mental*. 2007;30:11-18.
- Valadez Rodríguez J. *Neuroanatomía funcional*. Primera edición, México, Ediciones de neurociencias, 2002.
- Villalobos R, Torres CJ, Alonso VM, Rodríguez DVR; capítulo 4 Cirugía de Epilepsia en población pediátrica en *Lineamientos para el tratamiento quirúrgico de la epilepsia*. México. Programa prioritario de epilepsia 1995 p. 35-39.
- Volcy-Gómez V. Epilepsia del lóbulo temporal mesial: fisiopatología, características clínicas, tratamiento y pronóstico. *Revista de neurología*. 2004;38:663-667.
- Waxman SG. *Neuroanatomía clínica*. Primera edición, China, Editorial Lange, 2011.
- West M. J., *Basic Stereology for Biologist and Neuroscientists*, Spring Harbor Laboratory Press. 2012:1-3, disponible en: <http://www.stereology.info/stereology/> [Acceso 2 de Octubre 2015].
- Wieser HG, Blume WT, Fish D, Goldensohn E, Hufnagel A, King D, et al. ILAE Commission Report. Proposal for a new classification of outcome with respect to epileptic seizures following epilepsy surgery. *Epilepsia*, 2001;42:282-286.
- Williams JR, Sharp JW, Kumari VG, Wilson M, Payne JA. The Neuron-specific K-Cl Cotransporter, KCC2 antibody development and initial characterization of the protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:12656–12664.
- Wyllie E, Cascino GD, Gidal BE, Goodkin HP. Capítulo 18: Clasificación de las epilepsias en: *Treatment of epilepsy principles and practice*. Quinta edición, USA, Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- World Health Organization. Epilepsy. WHO; 2015. Fact sheets: 999.
- **Páginas WEB**
- Atlas de histología vegetal y animal. *Métodos de fijación*. Imagen disponible en: <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/2-metodos-fijacion.php> [Acceso 15 de Agosto 2014].
- Orientación diagnóstica de las crisis de aparición en la infancia; Capítulo 11. Disponible en: <http://www.epilepsiasen.net/node/29> [Acceso 22 de Enero de 2013].

- ¿Qué hay en tu cabeza? imagen, disponible en:
<https://deconstructingadri.wordpress.com/tag/biopsicologia/> [Acceso 15 de Agosto 2015].
- Universidad de costa rica, *Neurofisiología* imagen disponible en:
http://163.178.103.176/Fisiologia/neuro_prac_bas_1_5.html [Acceso 25 de Octubre 2015].
- Vademécum. Difenilhidantoína. 2014. Disponible en:
<http://mx.prvademecum.com/droga.php?droga=1176> [Acceso 12 de Febrero de 2016]
- Vademécum. Topiramato. 2014. Disponible en:
<http://mx.prvademecum.com/droga.php?droga=2785> [Acceso 12 de Febrero de 2016]