



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFECTO NEUROPROTECTOR DEL LEVETIRACETAM
SOBRE LA TOXICIDAD ESTRIATAL DEL ÁCIDO
QUINOLÍNICO EN RATAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

MARICELA DIRCIO BAUTISTA

Tutor

Dr. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL

Ciudad Universitaria, CDMX 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos Académicos

A la UNAM por permitirme el honor de ser parte de ella y forjarme como persona y científica.

Al Dr. Abel Santamaría por abrirme las puertas de su grupo de investigación en el Laboratorio de aminoácidos y por la paciencia que me tuvo en este largo camino.

A ti Anita Colín por tu ayuda, por compartirme conocimiento y porque este trabajo también es tuyo, te admiro.

A mis sinodales el profesor Agustín, la Dra. Alette y la Dra. Miñana por brindarme su tiempo y consejos para seguir creciendo académicamente. ¡Muchas gracias!

A la Dra. Juanita, la Dra. Sonia, la Dra. Esperanza y la Dra. Mari por permitirme llevar a cabo experimentos en sus respectivos laboratorios y por la calidez humana que poseen.

Dedicatoria

A mi mamá Leti, porque es el mejor ser humano del mundo y ser mi motivación, ¡Te amo ma'! Gracias también a ti papá.

A mi hijo †, porque su presencia me cambió y guio hasta donde estoy.

A los hombres de mi vida, Oscar y Migue. Nunca me han dejado sola y aunque la vida nos pone en situaciones difíciles sé que no vamos a separarnos nunca, ¡Los amo hermanitos!

A ti mi vida, Diego. Gracias por aparecer en mi camino, por nuestro hermoso amor y ser mi sostén, ¡Te amo cielo!

A mis mejores amigas Andy, Cris y Yara, cada momento que pasamos juntas es increíble, por estar en cada momento triste, de angustia o decepción para brindar las palabras exactas y seguir, ¡Las amo chatas!

A ti Gaby, desde tu llegada al laboratorio de aminoácidos, las tazas de café tuvieron un bonito significado, porque siempre tienes las palabras que necesito oír en momentos de angustia, porque tu amistad no es común, ¡Te quiero mucho!

Contenido

Índice de figuras, cuadros y gráficos	1
Abreviaturas	3
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Ganglios basales	5
1.1.1 El Cuerpo estriado	9
1.1.2 Trastornos hipocinéticos e hipercinéticos	11
1.1.3 La Dopamina (DA)	12
1.1.4 El Glutamato (Glu)	13
1.1.5 El Ácido γ -aminobutírico (GABA)	13
1.2 La vía de la Kinurenina (VK)	14
1.2.1 Metabolitos de la VK	15
1.2.2 El Ácido quinolínico (QUIN)	18
1.3 Excitotoxicidad y receptores NMDA	18
1.3.1 Mecanismo excitotóxico de QUIN	21
1.3.2 Estrés oxidativo	23
1.4 Epilepsia	23
1.4.1 Fisiopatología de la epilepsia	25
1.5 Fármacos antiepilépticos (FAEs)	25
1.6 Levetiracetam (LVT)	29
1.7 Teorías del mecanismo de acción del LVT	31
1.7.1 Proteína Sináptica Vesicular 2A	31
1.7.2 Transportador de cisteína/glutamato	32

1.8 Antecedentes del efecto neuroprotector del LVT	33
2. JUSTIFICACIÓN	36
3. HIPÓTESIS	36
4. OBJETIVO	
4.1 Objetivo general	37
4.2 Objetivos particulares	37
5. METODOLOGÍA	
5.1 Material biológico	38
5.2 Reactivos	38
5.3 Procedimiento experimental	38
5.4 Pre – tratamiento	40
5.5 Cirugía estereotaxica	40
5.6 Conducta motora en campo abierto	41
5.7 Eutanasia	41
5.8 Histología para Hematoxilina - Eosina (H-E)	41
5.9 Homogenizado de tejido estriatal	42
5.10 Obtención de sinaptosomas estriatales	42
5.11 Ensayo de liberación <i>ex vivo</i> de neurotransmisores	43
5.12 HPLC para DA	44
5.13 HPLC para Glu	44
5.14 Peroxidación lipídica	45

5.15 Proteínas oxidadas	45
5.16 Análisis estadístico	46
6. RESULTADOS	
6.1 El pre-tratamiento con LVT previene las alteraciones conductuales provocadas por la administración de QUIN	47
- Tiempo en movimiento 10 minutos	47
- Número de movimientos 10 minutos	48
6.2 El pre-tratamiento con LVT previene las alteraciones morfológicas provocadas por el QUIN	
- Histología con H-E y porcentaje de daño celular	49
6.3 El estímulo despolarizante con KCl favorece la liberación ex vivo de neurotransmisores en sinaptosomas estriatales	51
- Liberación de DA	52
- Liberación de Glu	53
- Liberación de GABA	54
6.4 El pre-tratamiento con LVt reduce los marcadores de estrés oxidante	55
- Peroxidación lipídica	55
- Proteínas oxidadas	56
7. DISCUSIÓN	57
8. CONCLUSIÓN	61
9. PERSPECTIVAS	61
10. BIBLIOGRAFÍA	62

Índice de figuras

- **Cuadro 1:** Clasificación de los tipos de convulsiones, parcial y generalizada. 24
- **Figura 1.** Localización anatómica de los ganglios basales en un corte coronal del encéfalo. 6
- **Figura 2.** Organización anatómica de las aferencias y eferencias de los ganglios basales. 7
- **Figura 3.** Vía directa e indirecta de los ganglios basales. 9
- **Figura 4.** Estructuras características del estriado. 10
- **Figura 5.** Vía de la kinurenina. 17
- **Figura 6.** Estructura del rNMDA. 20
- **Figura 7.** Proceso de activación del rNMDA. 21
- **Figura 8.** Representación esquemática de los mecanismos excitotóxicos mediado por QUIN. 23
- **Figura 9.** Esquema que representa los blancos de algunos FAEs. 30
- **Figura 10.** Estructura química del LVT. 33
- **Figura 11.** Línea del tiempo sobre la caracterización de la SV2A como sitio de unión del LVT. 34
- **Figura 12.** Esquema de la metodología utilizada en este trabajo. 42
- **Figura 13.** Tiempo en movimiento. 47
- **Figura 14.** Número de movimientos. 48
- **Figura 15.** Porcentaje de daño celular estriatal. 49
- **Figura 16.** Histología con H-E 50
- **Figura 17.** Ensayo para validar la liberación de neurotransmisores. 51

- Figura 18. Liberación de DA.	52
- Figura 19. Liberación de Glu.	53
- Figura 20. Liberación de GABA.	54
- Figura 21. Peroxidación lipídica.	55
- Figura 22. Daño oxidativo a proteínas.	56

Abreviaturas

6-OHD	6-hidroxidopamina
AAE	Aminoácidos excitadores
ACh	Acetilcolina
ACMS	2-amino 3-carboximunato 6-semialdehído
ACMSD	2-amino 3-carboximunato 6-semialdehído descarboxilasa
AK	Ácido kaínico
ANA	Ácido antranílico
AMS	2-amino muconato 6-semialdehído
AMPA	Ácido propiónico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol
AP	Ácido picolínico
ATC	Ácido tricloro acético
ATP	Adenosín trifosfato
AX	Ácido xanturénico
BHE	Barrera hematoencefálica
DA	Dopamina
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
EH	Enfermedad de Huntington
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
FAEs	Fármacos anti-epilépticos
GABA	γ -amino-butírico
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
GSH	Glutación reducido
HAAO	3-hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
H-E	Hematoxilina-Eosina
i.e.	Intraestriatal
IDO1,2	Indolamina 2,3-dioxigenasa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
iNOS	Sintasa del óxido nítrico inducible
i.p	Intraperitoneal
KAT	Kinurenina aminotransferasa
KMO	Kinurenina 3-monoxigenasa
KYN	Kinurenina
KYNA	Ácido kinurénico
KYNU	Kinureninasa
MDA	Malondialdehído
mGluRs	Receptores de glutamato metabotrópicos
NAD ⁺	Nicotín adenin dinucleótido
NADH	Nicotín adenin dinucleótido reducido
NOS	Sintasa del óxido nítrico
•OH	Radical hidroxilo
POx	Proteínas oxidadas

PVDF	Polifluoruro de vinilideno
QUIN	Ácido quinolínico
QPRT	Ácido quinolínico fosforibosil transferasa
rGABA-A	Receptor ionotrópico de GABA tipo A
rNMDA	Receptor de N-metil-D-aspartato
SE	Status epiléptico
SOD	Superóxido dismutasa
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TDO	Triptófano dioxigenasa
Try	Triptófano
VDCC	Canales de calcio voltaje dependiente
VK	Vía de la kinurenina
xCT	Transportador de cistina
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
OMS	Organización Mundial de la Salud

1. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso es uno de los principales componentes anatómicos para mantener a un organismo con vida; por medio de receptores se encarga de recibir información del entorno, enviarla al encéfalo para procesarla y efectuar una respuesta. La respuesta se efectúa mediante una unidad básica: la neurona. Las neuronas se relacionan funcionalmente para formar estructuras y así conforman las grandes divisiones del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP). Una de las principales respuestas es el control del movimiento. Este control de movimiento es un proceso complejo que implica la participación de diversas regiones del encéfalo, entre ellas los ganglios basales.

1.1 Ganglios basales

Los ganglios basales son un grupo de núcleos subcorticales que se localizan a los laterales del tálamo, participan en la integración sensorial y modulación del movimiento. Los componentes principales son el núcleo caudado-putamen, el globo pálido en su segmento interno y externo, y la sustancia negra compacta y reticulada (Góngora-Alfaro, 1990) (Figura 1). La comunicación de los ganglios basales es un asa que se origina en la corteza cerebral, converge en los diferentes núcleos que retorna información a las neuronas motoras de la corteza y regula el movimiento. Los ganglios cuentan con regiones de aferencia o entrada de información así como regiones de eferencia o salida. Las principales fibras aferentes son la corteza cerebral (corticoestriada), el tálamo (talamoestriada) y la región compacta de la sustancia negra (nigroestriada); mientras que las fibras que se consideran como

eferentes se dirigen al globo pálido (estriadopalidales) y a la región reticulada de la sustancia negra (estriadonígricas) (Purves *et al.*, 2008) (Figura 2).

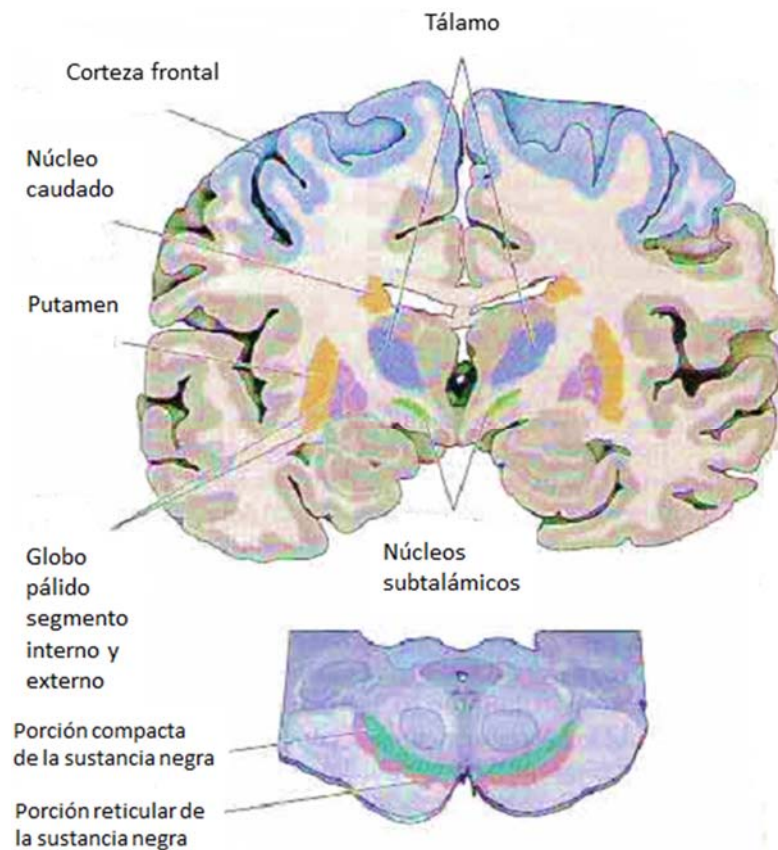


Figura 1. Localización anatómica de las estructuras de los ganglios basales en un corte coronal del encéfalo. El caudado-putamen es la principal región de los ganglios basales (amarillo), se separan por la cápsula interna y se localizan en el telencéfalo; la sustancia negra, se ubica en el mesencéfalo y el tálamo, en el diencéfalo. Estas últimas regiones son las principales estructuras diana de los ganglios para modular las neuronas de la corteza (Imagen modificada de Purves *et al.*, 2008).

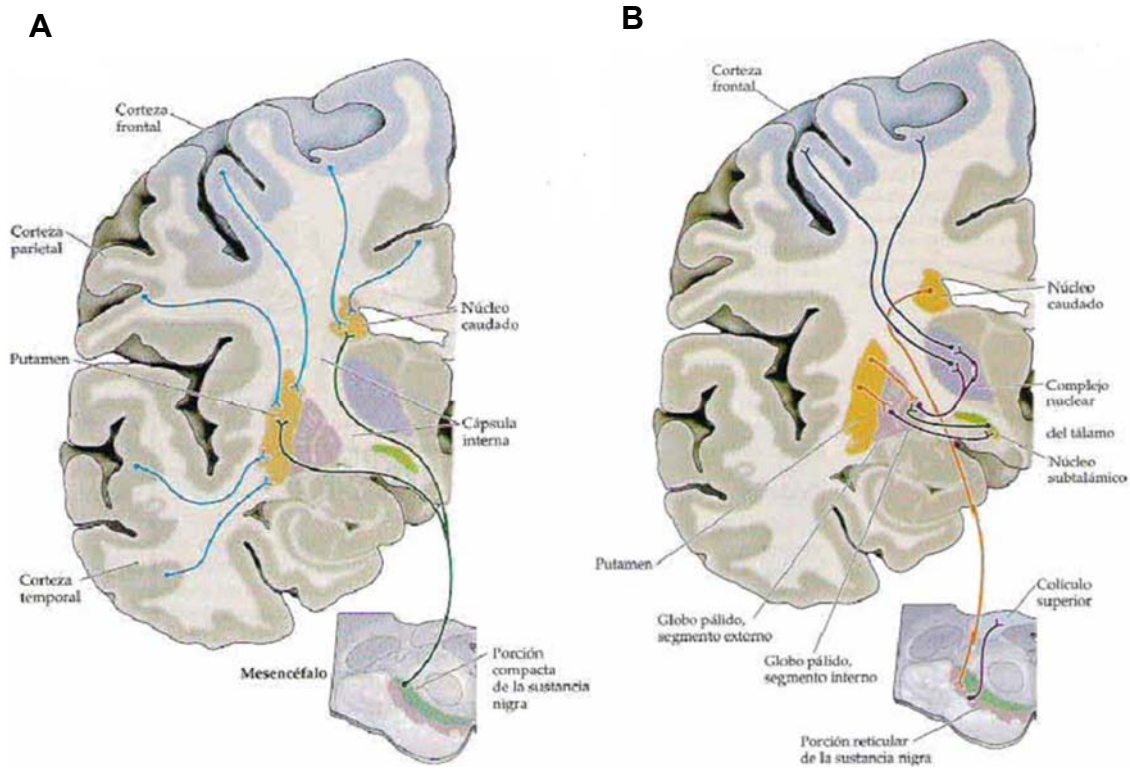


Figura 2. Organización anatómica de las aferencias y eferencias de los ganglios basales.

A) Fibras aferentes, proyecciones de la corteza y la porción compacta de la sustancia negra hacia el estriado; **B) Fibras eferentes**, se dirigen del estriado al globo pálido y a la región reticulada de la sustancia negra (Imagen modificada de Purves *et al.*, 2008).

El circuito de los ganglios basales se da por acciones opuestas a través del tálamo hacia el cuerpo estriado. Esta comunicación consta de una vía directa (excitadora, que libera a las neuronas motoras de la inhibición tónica) e indirecta (inhibitoria, que reduce la actividad del tálamo para inhibir a la corteza), y así facilitar los movimientos necesarios e inhibir los movimientos no deseados (Figura 3).

La primera vía proyecta neuronas GABAérgicas hacia la parte reticulada de la sustancia negra y la parte medial del globo pálido, e inhibe de forma tónica al tálamo. La vía se activa por el glutamato (Glu) y la dopamina (DA), lo que provoca la inhibición del globo pálido y al mismo tiempo desinhibe al tálamo, y

consecuentemente excita a las neuronas motoras de la corteza lo que inicia el movimiento. En la vía inhibitoria las neuronas estriatales contienen GABA, y se proyectan hacia la parte lateral del globo pálido. Este neurotransmisor va a inhibir al globo pálido, lo que ocasiona la desinhibición del núcleo subtalámico, por lo que se reduce el estímulo a las áreas motoras de la corteza e impide el movimiento. Cabe resaltar que la parte compacta de la sustancia negra brinda inervación dopaminérgica a las neuronas estriatales de ambas vías, por lo que el cuerpo estriado es la principal zona de acción de este neurotransmisor (Brunton *et al.*, 2007; Purves *et al.*, 2008).

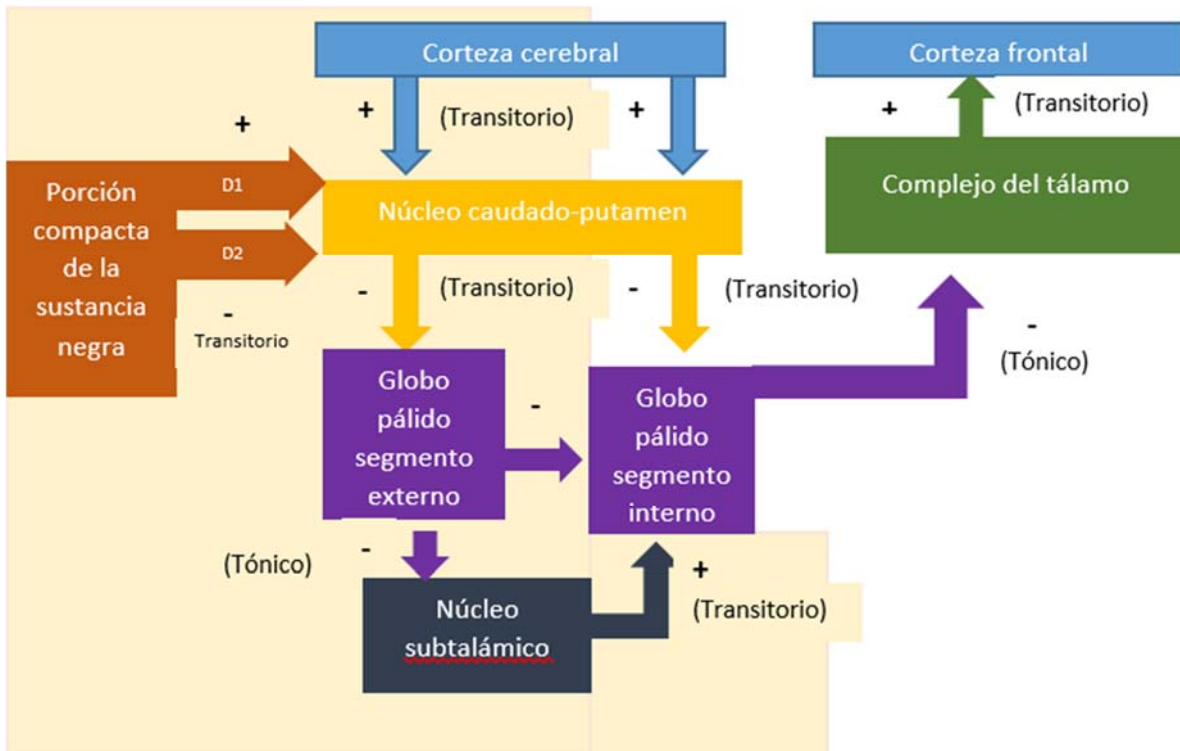


Figura 3. Vía directa e indirecta de los ganglios basales. Como simbología (+) excitador, (-) inhibitor. En la **vía directa** las fibras aferentes excitadas de la corteza llegan al estriado, esto inhibe de manera transitoria al segmento interno del globo pálido, desinhibe al tálamo y permite que otras aferencias exciten a las neuronas motoras de la corteza. En la **vía indirecta** (sombreado), las neuronas del estriado inhiben de manera transitoria al segmento externo del globo pálido y al núcleo subtalámico, este se proyecta al segmento interno del globo pálido para excitarlo, de esta manera se opone a la acción desinhibidora de la vía directa para modular sus efectos (Esquema tomado de Purves *et al.*, 2008).

1.1.2 El cuerpo estriado

El núcleo caudado y el putamen se estudian como una entidad única denominada cuerpo estriado que es la principal región de aferencia de información de los ganglios basales (Figura 4). El caudado es la región del estriado que controla las funciones asociativas y cognitivas; mientras que el putamen es responsable del

componente motor. Ambos núcleos comparten conexiones, características neuronales y sistemas de neurotransmisión pero están separados anatómicamente por la cápsula interna que son fibras ascendentes y descendentes (Wheeler y Carelli, 2008).

El estriado se caracteriza por tener estriosomas. Los estriosomas son agrupaciones de neuronas espinosas medianas nombradas así por el tamaño medio de su soma y por la gran cantidad de espinas que presentan las dendritas, son carentes de acetilcolinesterasa (enzima que degrada acetilcolina) y se encuentran embebidos en una matriz (Figura 4). Estas neuronas tienen pocos potenciales de acción espontáneos y necesitan la activación de sus fibras aferentes. Esta activación requiere del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) que ejerce actividad inhibitoria y neuromoduladora (Haines, 2003).

Los ganglios basales integran y modulan información cortical que influye en la iniciación y ejecución del movimiento, por lo que una lesión en alguna de sus regiones compromete la funcionalidad del sistema y alterar la conducta motora.

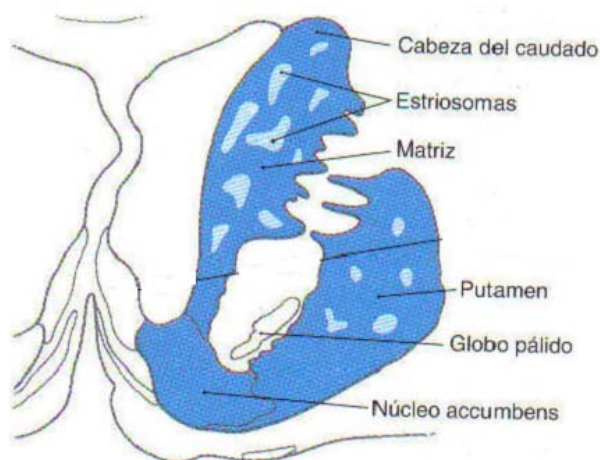


Figura 4. Imagen que representa las estructuras características del estriado: los estriosomas (azul claro) son agrupaciones neuronales carentes de la enzima que degrada al neurotransmisor acetilcolina y la matriz (azul rey) donde se encuentran embebidas (Imagen tomada de Haines, 2003).

1.1.3 Trastornos hipocinéticos e hiperkinéticos

El fenotipo de las alteraciones provocadas en los ganglios basales se clasifica en dos tipos de trastornos. A) Trastorno hipocinético que denota la reducción de movimientos, son de tipo acinesia o bradicinecia. La acinesia es una alteración importante en la capacidad para iniciar el movimiento, donde la mayoría de las neuronas están más activas durante la fase de planificación del movimiento que en la ejecución propia; y la bradicinecia, es una reducción en la velocidad y la amplitud del movimiento. Debido a la irrupción del equilibrio entre los flujos de eferencia de las vías directa e indirecta al tálamo, incrementa la inadecuada activación de los músculos antagonistas, sin afectar necesariamente la actividad muscular global (Haines, 2003).

B) Trastorno hiperkinético, es un movimiento anormal e involuntario denominado discinesia. Se debe a un desequilibrio entre la excitación de las neuronas palidotálamicas por la vía directa y la inhibición de la vía indirecta, por lo que disminuye la actividad neta de inhibición del circuito motor, y provoca una mayor actividad en la corteza. Se clasifican en tres tipos: balismo o hemibalismo, movimientos coreiformes y movimientos atetósicos. El primer tipo de discinesia consiste en sacudidas incontroladas en un solo lado de la extremidad superior o inferior, este trastorno está presente cuando hay lesiones en el núcleo subtalámico contralateral. El segundo tipo se caracteriza por movimientos irregulares de los cuatro miembros, de la cara y de la boca; los cuales se deben a la pérdida de neuronas espinosas medias del estriado y neuronas colinérgicas que proyectan al globo pálido lateral, por lo que se daña la vía directa, este tipo de discinesia es un fenotipo característico de la enfermedad de Huntington (EH).

Por último están los movimientos atetósicos, son lentos y sinuosos que se manifiestan en las porciones distales de las extremidades (Haines, 2003). Cuando se presenta un daño funcional en los ganglios basales, una de las principales causas es porque se ven comprometidas las interacciones neuroquímicas entre las regiones.

En el SNC la comunicación celular se da mediante contactos funcionales entre las neuronas para transmitir la información, denominadas sinápsis. Existen dos tipos, las eléctricas y las químicas. La primera constituye un porcentaje menor en la comunicación neuronal. Fluye a través de señales eléctricas por medio de los canales de membrana para permitir una corriente iónica y generar un potencial de acción que permita transmitir la información. La segunda es la más abundante, en ella la comunicación es posible gracias a la secreción de sustancias químicas denominadas neurotransmisores. Estos, son liberadas de las neuronas pre-sinápticas para ser captados por receptores específicos en las neuronas post-sinápticas e iniciar una respuesta (Purves *et al.*, 2008).

1.1.4 La Dopamina (DA)

La DA es uno de los neurotransmisores más importante del SNC que interviene en la actividad locomotora, la afectividad, la regulación neuroendócrina y la ingestión de agua y alimento. A nivel de SNP, es modulador de la función cardíaca y renal, del tono vascular y de la motilidad gastrointestinal (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000). Las neuronas estriatales de la vía directa expresan al receptor D1 excitador, y las de la vía indirecta expresan al tipo D2 inhibitor. Por lo tanto, la DA que llega al cuerpo

estriado tiende a incrementar la actividad de la vía directa y a reducir la de la vía indirecta (Brunton *et al.*, 2007). Por lo que se requiere de la activación simultánea de los dos receptores para efectuar la actividad motora (Góngora-Alfaro, 1990).

1.1.5 El Glutamato (Glu)

El Glu es un aminoácido no esencial que no atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE), por lo que se sintetiza en las células nerviosas a partir de la glucosa. Es el mensajero químico de mayor importancia en el SNC de mamíferos ya que constituye el sistema de neurotransmisión excitatoria más abundante. Interactúa con otras neuronas por medio de un sistema de reconocimiento específico a través de receptores localizados en la superficie de la membrana post-sináptica para mantener la adecuada comunicación neuronal. En condiciones patológicas, incrementa su presencia en el espacio sináptico y promueve un proceso excitotóxico responsable del daño neuronal asociado a diversas enfermedades neurodegenerativas (Dorado Martínez *et al.*, 2003).

1.1.6 El Ácido γ -aminobutírico (GABA)

El GABA es el principal neurotransmisor de tipo inhibitorio. Durante el desarrollo neuronal tiene la capacidad de activar una acción excitadora transitoria a través de los receptores GABA_A con un papel trófico en la plasticidad neuronal por medio de despolarizaciones (Varju *et al.*, 2001). Mientras que en el sistema nervioso desarrollado tiene una acción inhibitoria; mantiene el tono inhibitorio que contrarresta la excitación neuronal, un requisito fundamental para preservar la funcionalidad encefálica (Cortes-Romero *et al.*, 2011).

La disminución de GABA favorece eventos de excitación que pueden evocar procesos excitotóxicos y por lo tanto degeneración neuronal (Ramírez-Jarquín *et al.*, 2013).

1.2 La vía de la Kinurenina (VK)

El triptófano (Trp) es uno de los 20 aminoácidos esenciales y sirve como precursor para la síntesis de proteínas. La ruta catabólica del Trp en el cerebro de mamíferos, riñón e hígado es la vía de la kinurenina (VK) (Moroni *et al.*, 1988) (Figura 5). En condiciones fisiológicas se encarga de la síntesis de *novoo* de la coenzima Nicotin Adenin Dinucleótido (NAD^+) (Beadle *et al.*, 1947), el cual es un acarreador de electrones que se reduce reversiblemente a NADH por la adición de dos electrones y un protón en el anillo de nicotinamida (Ussher *et al.*, 2012).

En el torrente sanguíneo el 90% del Trp se encuentra circulando de forma libre mientras que el 10% restante se une a la albúmina. Solamente en su forma libre atraviesa la BHE con la ayuda de un transportador de aminoácidos tipo L no específico y competitivo. Del Trp que atraviesa la BHE y llega al encéfalo, el 95% se degrada por la VK y el 5% restante es metabolizado por la vía metoxindol para la biosíntesis de serotonina y melatonina (Jones *et al.*, 2013).

La vía inicia con la degradación del Trp en formilkinurenina por las enzimas indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO1 e IDO2, expresada en monocitos, macrófagos, microglía, astrocitos, neuronas y en algunos tipos de células troncales) o por la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO, expresada en hígado) (Lovelace *et al.*, 2016). La formilkinurenina se metaboliza en kinurenina (KYN) por la kinurenina formilasa. Como metabolito central de la vía, actúan tres enzimas diferentes para

metabolizarlo: primero, la kinureninasa forma el ácido antranílico (ANA); segundo, la aminotransferasa (KAT, expresada en astrocitos) forma el ácido kinurenico (KYNA); y el tercer metabolito se produce en condiciones inflamatorias por la acción la enzima kinurenina 3-hidroxilasa (en microglia) a 3-hidroxi-kinurenina (3-HK).

A partir de dos enzimas se va a producir el ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA): como precursor, el ANA se metaboliza por la ácido 3-hidroxiantranílico hidrolasa y cuando el precursor es el 3-HK actúa la enzima kinureninasa. La 3-HK es catalizada por la enzima ácido 3-hidroxiantranílico 3,4-dioxigenasa (3-HAO) para formar otro metabolito estable, el 2-amino 3-carboximucionato 6-semialdehído (ACMS) el cuál seguirá dos vías más: primero, de la enzima 2-amino 3-carboximucionato 6-semialdehído descarboxilasa (ACMSD) formará el precursor 2-aminomuconato 6-semialdehído (AMS), y por una reacción espontánea formará el ácido picolínico (AP); y por otro lado, el ACMSD va a sufrir una ciclización no enzimática para formar ácido quinolínico (QUIN). Finalmente, el QUIN es degradado por la enzima ácido quinolínico fosforribosiltransferasa (QPRT) para formar NAD^+ (Vamos *et al.*, 2009).

1.2.1 Metabolitos neuroactivos de la VK

La VK genera metabolitos denominados kinureninas. Estos son de dos vertientes: neuroactivos y modulares redox. El primer grupo compuesto por el KYNA y el QUIN tienen actividad directa en los receptores glutamatérgicos N-Metil-D-Aspartato (rNMDA). El segundo grupo de metabolitos lo conforman el AP con propiedades neuroprotectoras (Guillermin *et al.*, 2007); la 3-HK con una dualidad pro-oxidante como anti-oxidante (Colín-González *et al.*, 2013) y el 3-HAA con

actividad anti-inflamatoria y neuroprotectora en cultivos celulares (Krause *et al.*, 2011).

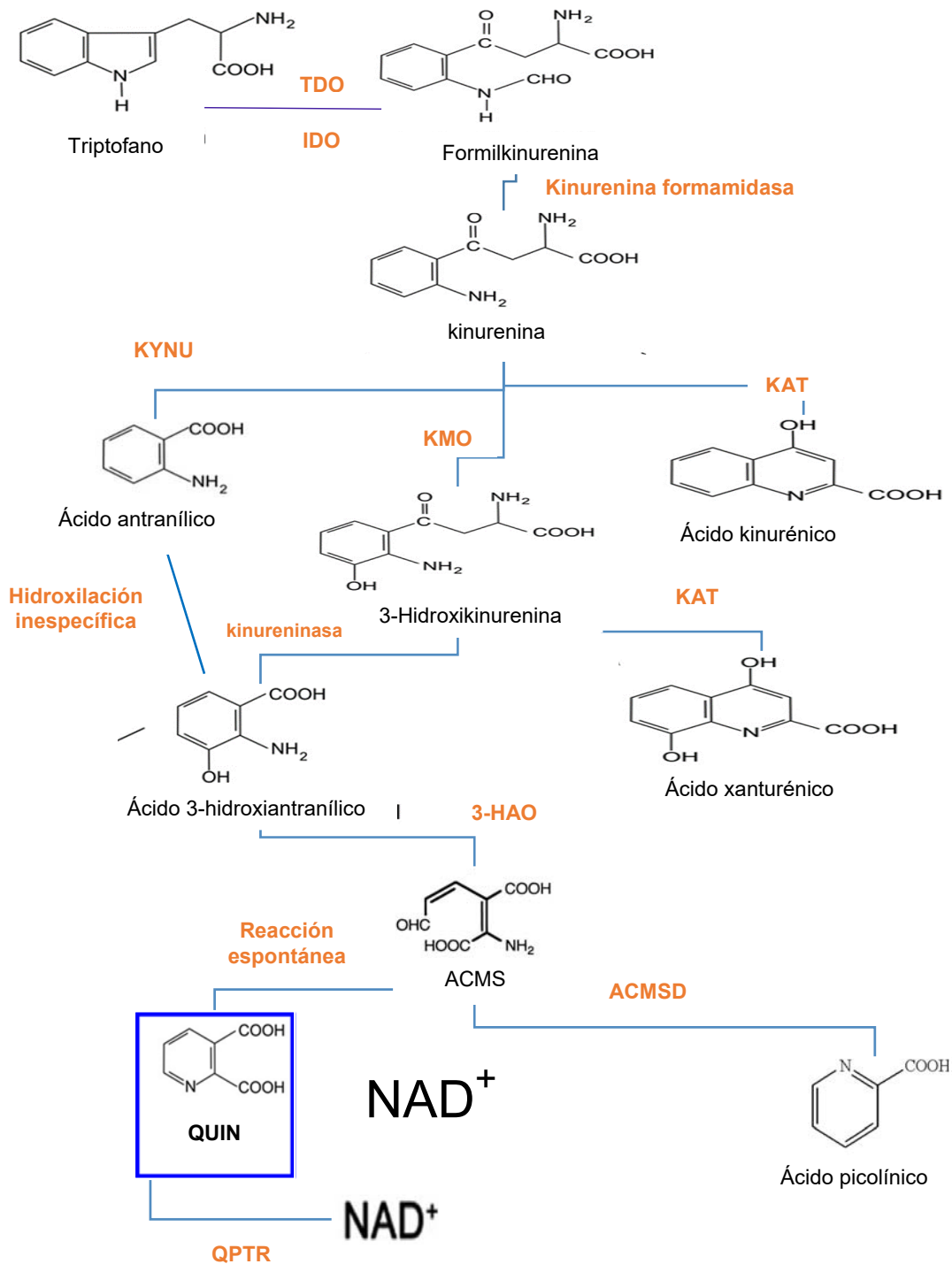


Figura 5. Vía de la kinurenina. Es la principal ruta catabólica del Trp en cerebro, hígado y riñón. Produce metabolitos con propiedades neuroactivas como el KYNA y el QUIN; u oxidativamente

reactivas como el AP, el 3-HK o el 3-HAA. El recuadro azul señala una de las kinuereninas neuroactivas relevantes para este trabajo: el QUIN. Triptofano 2,3-dioxigenasa (**TDO**); Indolamina 2,3-dioxigenasa (**IDO**); Kinurenina aminotransferasa (**KAT**); Kinurenina 3-monooxigenasa (**KMO**); Ácido 3-hidroxiantranílico dioxigenasa (**3-HAO**); 2-amino-3-carboximuconato-6-semialdehído (**ACMS**); 2-amino-3-carboximuconato-6-semialdehído decarboxilasa (**ACMSD**); Quinolínico fosforribosiltransferasa (**QPTR**). Esquema basado en Bohár *et al.*, 2015; Parrot y O'Connor 2015; Stone, 2001.

1.2.2 El Ácido quinolínico (QUIN)

El QUIN o ácido 2,3-piridina-dicarboxílico es un metabolito neuroactivo endógeno de la VK y es el precursor directo para la formación de NAD^+ . Se sintetiza en la microglia en el estado activo como respuesta a un evento inflamatorio en el SNC (Stone, 1993). Actúa como agonista selectivo de los rNMDA, induce una sobreestimulación que activa al receptor, permite el paso de Ca^{2+} , genera un evento neurotóxico y conduce a la muerte neuronal (Schwarcz y Kohler, 1983).

La concentración de QUIN en el SNC no es homogénea e incrementa conforme avanza la edad, esto debido a que en un adulto la maquinaria enzimática está consolidada y ante cualquier alteración, es capaz de responder de manera eficaz, lo que favorece su síntesis (Moroni *et al.*, 1984). Otro factor que contribuye a su incremento extracelular, es la disminución en la expresión de la enzima que lo degrada (QPRT, en astrocitos y células ependimales); esta acumulación del metabolito favorece eventos excitotóxicos (Jhamandas *et al.*, 1999).

1.3 Excitotoxicidad y receptores NMDA

En 1969 Olney definió el concepto de excitotoxicidad como el mecanismo tóxico donde la sobre-estimulación de receptores para aminoácidos excitadores (AAE) conduce a la muerte neuronal.

El Glu una vez sintetizado se acumula en la terminal sináptica para ser liberado por un proceso dependiente de Mg^{2+}/ATP . Un estímulo eléctrico neuronal inducen la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC) y promueve la excitosis. El Glu una vez liberado al espacio sináptico, interactúa con sus receptores específicos en la membrana post-sináptica para producir diversas respuestas biológicas (Flores-Soto et al., 2012).

El glu interacciona con diferentes tipos de receptores, los cuales se han clasificado por sus características farmacológicas y electrofisiológicas en ionotrópicos (NMDA y no-NMDA) y metabotrópicos (mGluR 1-8). El primer grupo esta acoplado a un canal, por lo que no necesitan de ninguna fuente energética y el transporte es pasivo. En función de su ligando específico son: los N-metil-D-aspartato (nNMDA) y los no-NMDA como α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazolil-4-propionato (AMPA) y los receptores kainato. Los receptores AMPA son permeables a Na^+ y K^+ , en algunos casos a Ca^{2+} , intervienen en la transmisión glutamatérgica rápida y se encuentran a nivel postsináptico. Los receptores de kainato se localizan a nivel pre- y post-sináptico, y sabe que participan en la modulación de la transmisión GABAérgica. Por otro lado, los receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G que modulan la respuesta a través de segundos mensajeros intracelulares (Millán, 2003).

Los rNMDA poseen una estructura tetramérica conformada por una combinación de siete subunidades: NR1, NR2 (A-D) y NR3 (A, en todo el SNC y B, en neuronas motoras) (Figura 6). El canal del receptor está formado por el dímero NR1/NR2. La subunidad NR1 proporciona el sitio de unión a glicina (Gly), mientras que NR2 proporciona el sitio de unión a Glu y a poliamidas; además de este dímero, debe expresarse alguna de las demás subunidades de NR2 o NR3, este último aunque no proporciona funcionalidad al receptor posee acción moduladora de forma negativa al disminuir la permeabilidad al Ca^{2+} . La función fisiológica del receptor radica en el acoplamiento de las señales bioquímicas y eléctricas de las neuronas por la afluencia de Ca^{2+} en respuesta a la actividad sináptica (Zito y Scheuss, 2009).

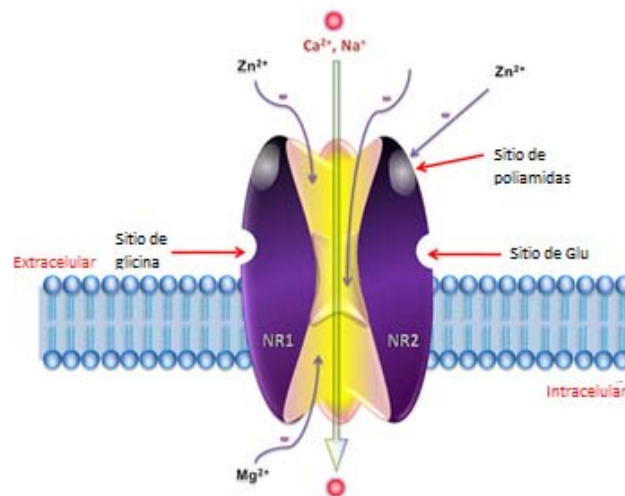


Figura 6. Estructura del rNMDA. Uno de los dímeros del receptor está formado por dos subunidades NR1 y las dos restantes por la combinación homo o heteróloga de las subunidades NR2 (A-D) o NR3 (A-B) (Imagen modificada de Ghasemi y Schachter, 2011).

La activación del rNMDA requiere la unión simultánea del agonista (Glu) y del co-agonista (Gly); y la despolarización membranal para que el tapón de Mg^{2+} que bloquea el canal pierda la afinidad y se remueva, de esta manera permite la entrada de Ca^{2+} y Na^{+} y la salida de K^{+} . (Lynch y Guttman., 2001) (Figura 7).

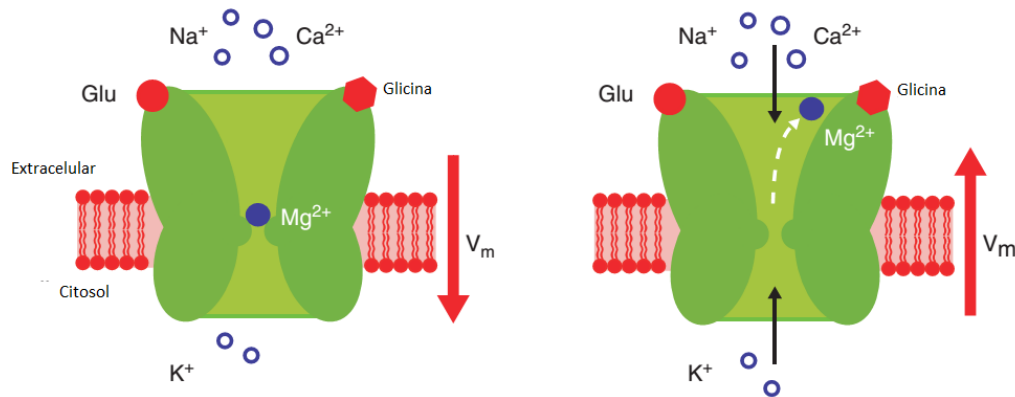


Figura 7. Proceso de activación del rNMDA. Inicia con la unión simultánea del agonista Glu y del co-agonista Gly a los sitios de unión correspondientes, aunado a la despolarización membranal que remueve el tapón de Mg^{2+} del canal y conjuntamente promueve el paso intracelular de Ca^{2+} y Na^{+} y la salida de K^{+} , esto activa vías de señalización inducidas por Ca^{2+} (Imagen tomada de Zito y Scheuss, 2009).

La señalización glutamatérgica que se genera por la activación del rNMDA está formada por un componente rápido seguido de uno lento. El primero está a cargo de los no-NMDA y como la afinidad del complejo agonista-receptor es menor, la disociación es rápida por lo que efecto es momentáneo. El segundo componente se da por parte de los rNMDA, la afinidad del Glu es mayor por lo que la disociación es muy lenta y produce un efecto prolongado para permitir el cierre y apertura del canal repetidas veces (Lester y Jahr, 1992).

1.3.1 Mecanismo excitotóxico de QUIN

El QUIN, análogo del Glu, produce eventos excitotóxicos cuando sus niveles basales se incrementan. Este metabolito principalmente actúa al sobre estimular a los rNMDA aunque se han reportado dos vías más (Figura 8).

Actúa como agonista selectivo de los rNMDA, al competir por el sitio de unión a Glu. La unión del QUIN al receptor no excluye la presencia del Glu; ambas moléculas permiten la activación continua del receptor y esto mantiene el flujo intracelular del Ca^{2+} de forma masiva (Schwarcz *et al.*, 1984). Este ion actúa como segundo mensajero y activa 1) fosfolipasas, cinasas, proteasas, endonucleasas, citocromo C, calpainas; 2) incrementa la expresión de NOS; 3) disminuye la expresión de la superóxido dismutasa (SOD), lo cual favorece el incremento de especies reactivas de oxígeno (ERO) y/o de nitrógeno (ERN); y 4) activa caspasas. Todo esto en conjunto induce la muerte celular por apoptosis o necrosis (Pérez-De la Cruz *et al.*, 2012).

El efecto tóxico del QUIN también está relacionado con la habilidad para formar ERO. En el espacio extracelular el QUIN forma un complejo con iones hierro (Fe^{2+}) y como ocurre en la reacción de Fenton induce la formación de ERO, especialmente radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) (Pérez-De la Cruz *et al.*, 2012). Además, el QUIN incrementa sus concentraciones extracelulares, bloquea los transportadores de Glu en células gliales y evitar la recaptura del neurotransmisor para que se degrade y potenciar el efecto tóxico del QUIN (Pérez-De la Cruz *et al.*, 2012).

En conjunto, los mecanismos activados por el QUIN producen estrés oxidante, déficit en el metabolismo energético y promueven la muerte celular (Trotti *et al.*, 1998; Platenik *et al.*, 2001).

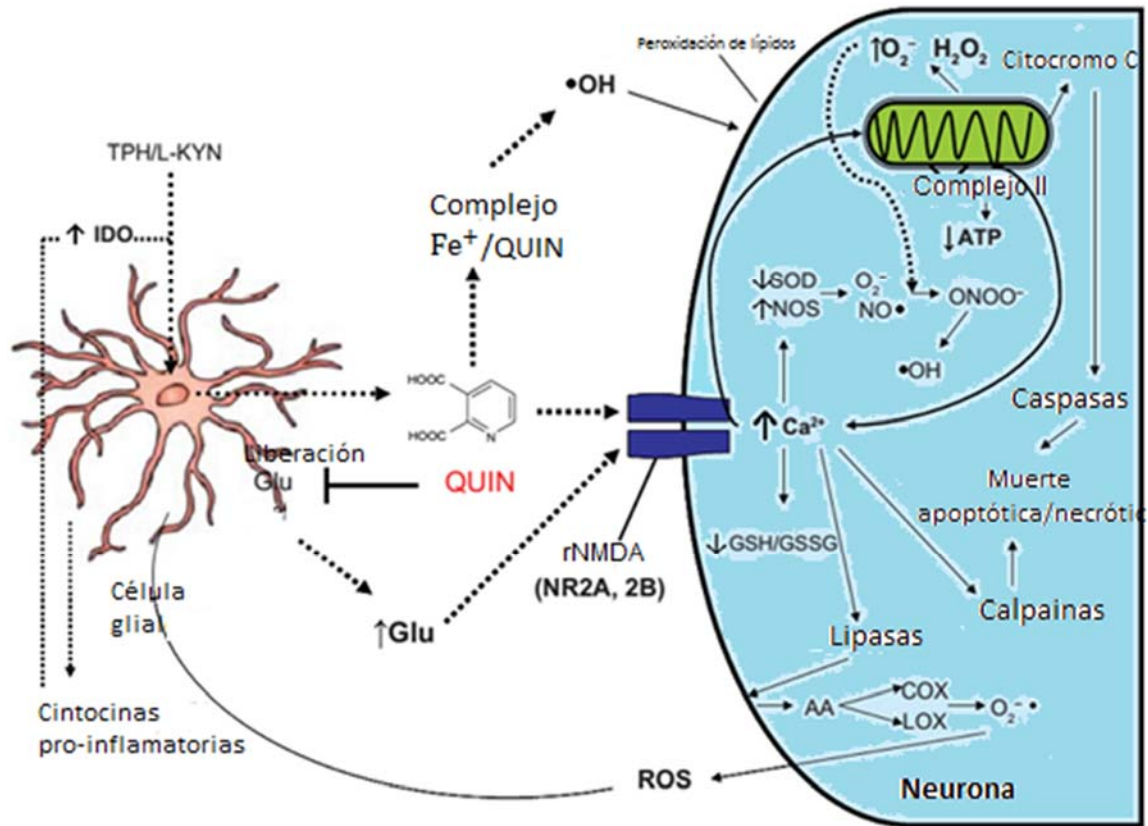


Figura 8. Representación esquemática de los mecanismos excitotóxicos mediado por QUIN.

El QUIN actúa como agonista de Glu en el sitio de unión de los rNMDA, provoca una sobreestimulación y permite así la entrada masiva de Ca^{2+} para activar diferentes vías de señalización intracelular. A nivel extracelular, forma el complejo $Fe^{2+}/QUIN$ que favorece la formación de ERO e induce estrés oxidativo. Finalmente, en las células gliales, inhibe la recaptura de Glu y potencia el efecto excitatorio (Imagen tomada de Pérez-De la Cruz *et al.*, 2012).

1.3.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una condición metabólica que ocurre cuando se presenta un desequilibrio entre la producción de especies pro-oxidantes y los sistemas de defensa anti-oxidante, por lo que incrementa la concentración de radicales libres y ERO. Un estado oxidante, induce efectos tóxicos a nivel de lípidos, proteínas o nucleótidos y genera muerte celular. Esta condición está presente en todas las enfermedades neurodegenerativas; sin embargo, no se conoce claramente si es causa o consecuencia del daño neuronal (Dorado Martínez *et al.*, 2003).

1.4 Epilepsia

La Organización Mundial de la Salud (OMS) anunció que hasta febrero de 2017 existen 50 millones de personas a nivel mundial que padecen epilepsia y se estima que la prevalencia media es de cuatro a diez afectados por cada 1000 personas.

La epilepsia es una patología neurológica crónica caracterizada por la presencia de convulsiones recurrentes y espontáneas, generadas por una descarga excitatoria, sincrónica y sostenida de un grupo de neuronas. No se conoce la etiología de la enfermedad, pero está asociada a diversos factores como tumores, infecciones, traumas craneoencefálicos, privación de oxígeno, alteraciones genéticas y alteraciones metabólicas (Engelborghs *et al.*, 2000). Aunque no es considerada una enfermedad neurodegenerativa, provoca muerte neuronal asociada a excitotoxicidad (Pereno, 2010).

La crisis epiléptica es un episodio de movimientos involuntarios que afecta solamente una zona de la región cerebral (convulsión parcial o focal) o la totalidad del encéfalo (convulsión generalizada). Dentro de estas dos clasificaciones se subdivide en diferentes categorías como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de los tipos de convulsiones, parcial y generalizada.

Convulsión parcial	Convulsión generalizada
<p>Temporal: Epilepsia temporal lateral (ETL) que inician en la neocorteza con auras autonómicas, psíquicas, visuales, auditivas y vertiginosas. Epilepsia temporal medial (ETM) comienza en la zona mesial con auras epigástricas, desconexión del medio acompañada de automatismos orales o manipulativos y postura distónica de un miembro.</p>	<p>Tónica: Contracciones musculares que incrementa de segundos a minutos debido a una descarga excitatoria rítmica primaria.</p>
<p>Frontal: De menor duración que una temporal, tiene un inicio abrupto y generalización secundaria más frecuente, menor grado de confusión post-ictal, predominan los fenómenos motores que automatismos más forzados.</p>	<p>Clónica: Contracciones repetitivas y prolongadas en el mismo grupo muscular sin afectar la conciencia.</p>
<p>De la corteza posterior: Abarca epilepsias parietales y occipitales con manifestaciones cambiantes, incluso en un mismo paciente. Auras vertiginosas o auditivas, síntomas somatosensitivos, visuales como luces, destellos, colores simples, amaurosis o alucinaciones visuales complejas, metamorfopsias, distorsiones de la imagen corporal y palinopsia, parpadeo unilateral y el nistagmo. Éste tipo de crisis suele propagarse a los lóbulos temporal y frontal, por lo que la sintomatología que sigue, se asemeja a la de estas epilepsias.</p>	<p>Tónico-clónico: Comienza con mioclonías, una fase de flexión y extensión tónica con cierre brusco de la boca, apnea, cianosis, una fase de vibración o transición de tónico a clónico, contracciones clónicas flexoras masivas y repetidas que se prolongan y posteriormente disminuye la fuerza y frecuencia, finalmente un periodo de estupor con hipotonía y sialorrea hasta la recuperación gradual normal.</p>
	<p>De ausencia: Pérdida de conciencia paroxística, sin aura, sin asociación de caída, clonías, atonías o mioclonías y recuperación rápida.</p>
	<p>De ausencia atípica: La pérdida de la conciencia puede ser menor pero más prolongada, con componentes atónicos, tónicos y automatismos. Es característica de síndromes epilépticos con retraso psicomotor asociado.</p>
	<p>Mioclónicas: Descargas corticales que producen contracciones involuntarias bilaterales, simétricas y sincrónicas con afectación predominante de hombros y brazos sin afectar la conciencia.</p>
	<p>Atónica: Aparece después de una disminución brusca del tono muscular en flexores y extensores del cuello, tronco y extremidades, sin ningún evento previo mioclónico o tónico, hay confusión sin pérdida de memoria, puede aparecer en varios tipos de crisis, con duración de 1-2 segundos.</p>

(Basado en Mercadé Cerdá *et al.*, 2012).

1.4.1 Fisiopatología de la epilepsia

Como se mencionó, una crisis convulsiva forma parte de la epilepsia, y se desencadena por descargas de excitabilidad excesiva y sincronizada de una población de neuronas. La comunicación neuronal está dada por un equilibrio de señalización excitatoria (Glu) e inhibitoria (GABA); si ese equilibrio se altera se disparan impulsos excitatorios descontrolados que conllevan a una crisis epiléptica, la crisis depende de la región encefálica donde se focalice (parcial) o que se propague la descarga a otros grupos neuronales (generalizada). Se han estudiado solamente algunas regiones del encéfalo donde se localizan principalmente los focos epilépticos como son la corteza, el hipocampo, la amígdala, los bulbos olfatorios y el colículo inferior de la vía auditiva (Sayin *et al.*, 2003).

Los mecanismos implicados en la generación de la epilepsia son extremadamente complejos por lo que hay muchas hipótesis, y una de las más aceptadas es la alteración en el sistema inhibitorio. En muestras de tejidos de pacientes con algún tipo de epilepsia que no respondieron al tratamiento, se observó una pérdida en la neurotransmisión GABAérgica. Por el contrario, también se ha observado que la epilepsia puede implicar un aumento de esta señalización por un mecanismo compensatorio debido al exceso de excitabilidad glutamatérgica (Cabo-de la Vega *et al.*, 2006).

1.5 Fármacos antiepilépticos

Existe una gama de fármacos antiepilépticos (FAEs) con mecanismos de acción disponibles para el tratamiento de las convulsiones, el 30% de los pacientes no tienen control de las crisis en su medicación actual, lo que representa una necesidad clínica importante (Kwan y Brodie, 2000). Los FAEs comparten un fin común: el de

disminuir la excitabilidad neuronal y se diferencian en la farmacología y composición química (Siniscalchi *et al.*, 2013) (Figura 9). Estos fármacos se clasifican en convencionales y de nueva generación:

- **FAEs convencionales:** son aquellos que surgieron antes de 1990.
 - Acetazolamida: inhibe la actividad de la anhidrasa carbónica.
 - Carbamacepina: bloquea canales de Na^+ dependientes de voltaje.
 - Clobazam, clonacepam, diacepam, fenobarbital, loracepam y primidona: modulador alostérico de rGABA-A.
 - Etosuximida: bloquea canales de Ca^{2+} tipo T.
 - Fenitoina: bloquea canales de Na^+ dependientes de voltaje.
 - Valproato: favorece la síntesis de GABA y bloquea canales de Na^+ .
- **FAEs de nueva generación:** son fármacos que surgieron después de 1990, los cuales ofrecen menores efectos adversos con respecto a los FAEs convencionales.
 - Acetato de eslicarbazepina: bloquea canales de Na^+ dependientes de voltaje.
 - Felbamato: bloquea canales de Na^+ , de Ca^{2+} y rNMDA.
 - Gabapentina: inhibe canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.
 - Lamotrigina: bloquea canales de Na^+ dependientes de voltaje e interviene en la inhibición de liberación de Glu.
 - Lacosamida: incrementa la acción inhibitoria de los canales de Na^+ de inactivación lenta.

- Levetiracetam (LVT): inhibe canales de Ca^{2+} tipo N y se une a la proteína vesicular sináptica 2A (SV2A) para modular la liberación de neurotransmisores.
- Oxcarbacepina: bloquea canales de Na^+ y Ca^{2+} y posiblemente actúe en canales de K^+ .
- Perampanel: inhibe receptores no-NMDA.
- Pregabalina: inhibe la unión con la subunidad $\alpha 2\delta$ de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.
- Retigabina: interacción con canales de K^+ (KCNQ/Kv7) dependientes de voltaje.
- Tiagabina: bloquea la recaptura de GABA.
- Topimarato: incrementa la actividad de GABA, inhibe los canales de Na^+ , dependientes de voltaje, inhibe receptores no-NMDA e inhibe la actividad de la anhidrasa carbónica.
- Vigabatrina: inhibe la enzima GABA transaminasa.
- Zonisamida: bloquea canales de Ca^{2+} y de Na^+

El mecanismo de acción de cada uno de los FAEs no es completamente conocido, por lo que dan pie para un reposicionamiento terapéutico; lo que significa que el fármaco se utilice para el tratamiento de alguna patología neurológica distinta de la que fue prescrita (Naylor y Scholinfeld, 2014).

Dentro de los FAEs el LVT es uno de los que poseen mayor eficacia farmacológica, es de amplio espectro de acción, posee una mínima interacción con otros fármacos, se posiciona como el antiépléptico de mayor seguridad y posee un

mecanismo de acción novedoso. Por lo que el interés de este trabajo de investigación se enfoca exclusivamente en el LVT.

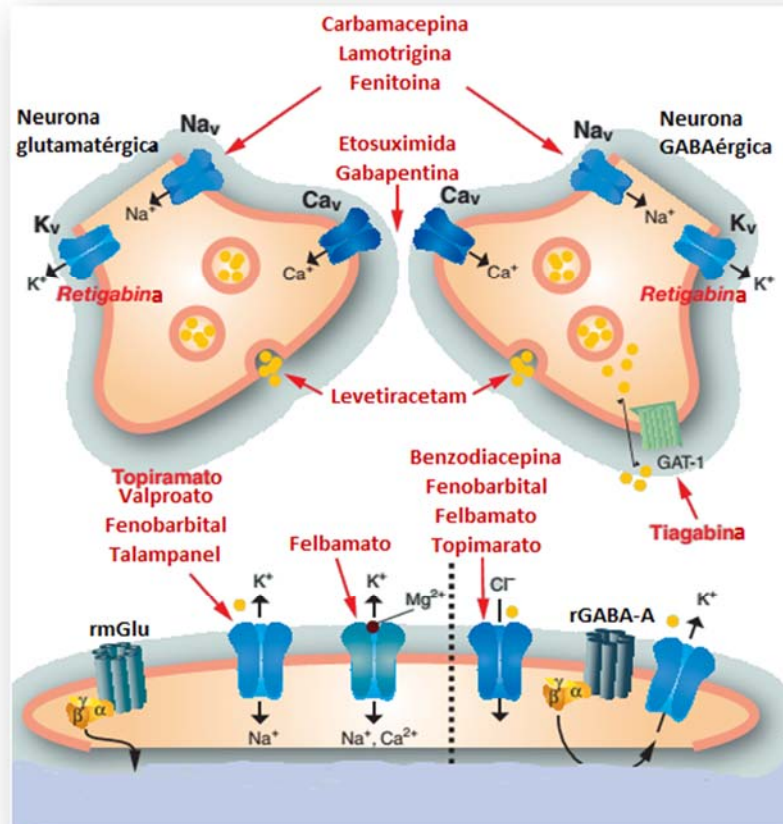


Figura 9: Esquema que representa los blancos de algunos FAEs. A nivel pre-sináptico: en neuronas glutamatergicas como GABAérgicas: Carbamazepina, lamotrigina y fenitoina actúan en canales de Na^+ dependientes de voltaje; etosuximida y gabapentina en canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje; retigabina en canales de K^+ dependientes de voltaje; levetiracetam se une a la SV2A; y la tiagabina actúa en el transportador de GABA dependiente de Cl^- y Na^+ (GAT-1). **En las terminales post-sinápticas:** topiramato, valproato, fenobarbital y talampanel ejercen acción en los receptores AMPA/kainato; felbamato en rNMDA y por último las benzodiazepinas, fenobarbital, felbamato y topiramato en rGABA-A. Todos ellos con el fin de disminuir la excitabilidad neuronal (Imagen modificada de Böhme y Lüddens, 2007).

1.6 Levetiracetam (LVT)

El LVT ó [S]- α -etil-2-oxo-1-pirrolidina acetamida, es el S- enantiómero del piracetam (Figura 10). El piracetam fue el primer fármaco antiepiléptico de la familia de los racetams. Derivado de este se generaron otros fármacos mediante pequeñas modificaciones en la estructura química con el objetivo de potenciar su acción terapéutica. Estos cambios en la estructura molecular dan lugar a nootrópicos más potentes que el antecesor o a sustancias con diferentes indicaciones terapéuticas (Gouliayev y Senning, 1994). La fórmula molecular del LVT es $C_8H_{14}N_2O_2$ y tiene un peso molecular de 170.21 g/mol, lo que lo hace altamente soluble en agua (Targas *et al.*, 2014).

El LVT es un FAE de segunda generación, es novedoso por su peculiar perfil farmacológico ya que actúa mediante la unión a la proteína vesicular sináptica 2A (SV2A) para suprimir las convulsiones, aunque no se tiene conocimiento esclarecido de cómo es que modula esta supresión. Es prescrito como terapia coadyuvante o como monoterapia (con una dosis inicial de 500 mg dos veces al día, con un ascenso de máximo 3 g por día) en el inicio de convulsiones parciales con o sin generalización secundaria (Wright *et al.*, 2013).

Clínicamente el fármaco ha demostrado un amplio espectro de actividad anticonvulsivante en la epilepsia mioclónica juvenil, en epilepsia tónico-clónico, de ausencia y mioclónica, epilepsia fotosensitiva, de ausencia atípica y convulsiones atónicas, en epilepsia parcial infantil y como monoterapia en pacientes con epilepsia parcial refractaria (Di Paola *et al.*, 2007).

Respecto a la farmacocinética, después de una administración por vía oral, se absorbe rápidamente cerca del 95%, alcanza la máxima concentración (Cmax) en sangre a los 80 minutos y su vida media es de seis a ocho horas. El porcentaje de unión a proteínas plasmáticas es del <10%, por lo que no compete con otros fármacos por el sitio de unión; el 24% del fármaco se metaboliza por la hidrólisis del grupo acetamida y genera otros metabolitos sin actividad biológica, y el 66% del LVT no se metaboliza por lo que se desecha de manera inalterada (Patsalos, 2004).

El LVT se excreta por dos vías, principalmente por la vía renal y minoritariamente por la vía hepática. En la primera el fármaco se elimina de forma inalterada y como un metabolito farmacológicamente inactivo (ucb L057), el cual proviene de la hidrólisis de una esterasa en el grupo acetamida. En la vía hepática, la exposición incrementa con la disminución funcional del órgano, por lo que en pacientes con algún daño severo se recomienda un ajuste de dosis (Patsalos, 2004).

Algunos de los efectos adversos del LVT son mareo (52.8%), somnolencia (33.3%), fatiga (11.1%) y dolor de cabeza (8.3%) (Wright *et al.*, 2013).

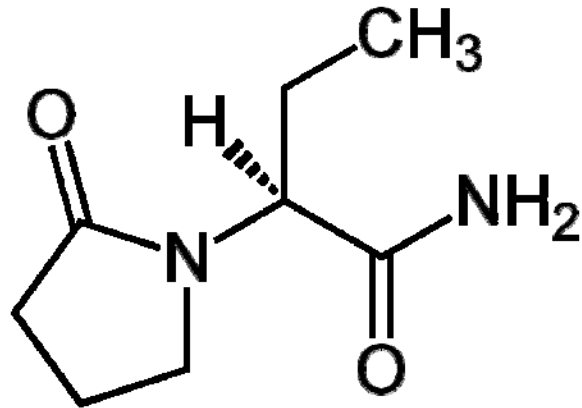


Figura 10: Estructura química del LVT. El LVT está formado por un grupo acetamida, por donadores de protones (COO^-), un donador de puente de hidrógeno (H^+), un grupo hidrofóbico (CH_3) y un grupo con carga positiva (NH_2) (Imagen tomada de Sarmiento, 2014).

1.7 Teorías sobre el mecanismo de acción del LVT

La literatura sugiere al LVT como tratamiento de diversas enfermedades diferentes a la epilepsia. Por lo que ha generado el interés de investigación de su mecanismo de acción, de los cuales predominan: la unión a la SV2A y el transportador de cistina/Glu.

1.7.1 Proteína Vesicular Sináptica 2A (SV2A)

La SV2A se caracterizó desde 1985 como la proteína más abundante en la membrana de las vesículas sinápticas en neuronas y células endócrinas (Lynch *et al.*, 2004), se ha caracterizado como el sitio de unión de fármacos anticonvulsivantes derivados de la familia de los racetam para modular la exocitosis de neurotransmisores (Kaminski *et al.*, 2008).

La SV2A es una glicoproteína transmembranal que modula la exocitosis de neurotransmisores dependiente de Ca^{2+} . En mamíferos existen tres isoformas:

SV2A, SV2B y SV2C, con una distribución ubicua. La isoforma 2A es omnipresente en el SNC; la expresión de la isoforma 2B es más específica y predomina en hipocampo y cerebelo; mientras que la distribución de la 2C se limita a los ganglios basales, mesencéfalo y el tronco encefálico (Madeo et al., 2004). Se esquematiza una línea del tiempo de la caracterización de la SV2 (Figura 11).

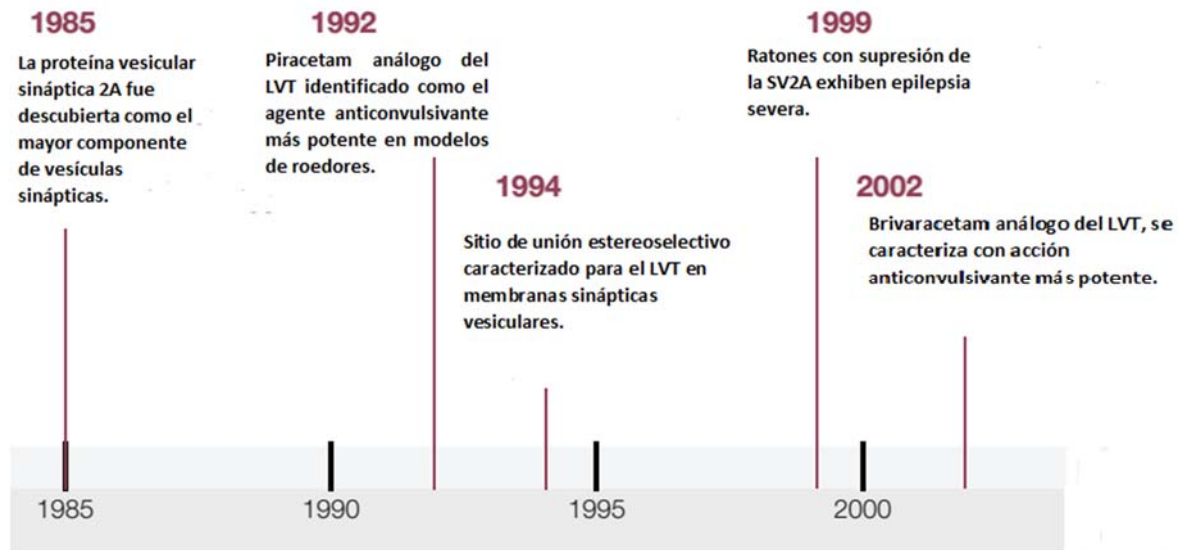


Figura 11: Línea del tiempo de la caracterización de la SV2A como sitio de unión del LVT. En 1985 la SV2A se caracterizó como la proteína con mayor presencia en las vesículas sinápticas; en 1992, el piracetam fue el primer fármaco de la familia de los racetams; en 1994 se determinó al LVT como ligando de la SV2A y finalmente en 2002 se formuló un fármaco de tercera generación, el brivaracetam 10 veces más afín a la SV2A (Esquema modificado y traducido de Rogawski, 2016).

1.7.2 Transportador de cistina/glutamato

En las células nerviosas de mamíferos se expresan transportadores para movilizar aminoácidos de manera intracelular. Existe un sistema de transportadores denominado X_c^- expresado en astrocitos, que consta de una subunidad funcional xCT/SLC7A11 y una chaperona CD98/4F2hc. Este sistema funciona como un

intercambiador de cistina/glutamato donde los astrocitos capturan cistina del espacio extracelular y lo reducen a cisteína para que se sirva como sustrato en la síntesis de glutatión reducido (GSH) en las neuronas (Miyazaki *et al.*, 2015). El GSH actúa en la célula como un sistema antioxidante para contrarrestar los efectos de las ERO (Weijie *et al.*, 2011). Existen reportes previos que afirman que la administración de LVT incrementa la expresión del transportador xCT, lo que proporciona un efecto neuroprotector al incrementar la síntesis de GSH (Ueda *et al.* 2009).

1.8 Antecedentes del efecto neuroprotector del LVT

El mecanismo de acción del LVT no se ha dilucidado totalmente, por lo que a continuación se resumen algunos trabajos experimentales y clínicos del LVT que demuestran su efecto neuroprotector.

- **Marini** y colaboradores en 2004 evaluaron el efecto neuroprotector del LVT (50 mg/kg) en el daño inducido por ácido kaínico (análogo de glu). El tratamiento con el fármaco disminuyó la peroxidación de lípidos; previno la disminución de GSH y disminuyó la expresión del RNAm para la IL-1 β .
- **Gibbs y Cock** en 2007 usaron ratas para estimularlas eléctricamente durante 5-6 días por 2 h. En el último día, 5 h después de la estimulación, administraron i.p. el LVT (1000 mg/kg). El fármaco no restauró la disfunción mitocondrial así como los niveles de GSH. Los autores sugieren que a las 5 h la cascada bioquímica está muy avanzada como para ejercer el efecto protector.

- **Abdel-Wahab** y colaboradores en el 2015, realizaron un pre-tratamiento combinado en ratas wistar con LVT (30 mg/kg) i.p y Omega 3 (200 mg/kg) vía oral, ante convulsiones inducidas en el hipocampo con el modelo de kindled pentilentetrazol (PTZ). Las convulsiones se atenuaron, el deterioro cognitivo disminuyó, así como la recuperación de GSH, GSH peroxidasa y super óxido dismutasa (SOD).
- **Miyazaki** y colaboradores en 2015, evaluaron el efecto neuroprotector del LVT (500 μ M) en cultivos de astrocitos y co-cultivos (neuronas-astrocitos) del mesencéfalo y estriado de embriones de ratas Sprague-Dawley durante 6, 15 y 24 h. Utilizaron 6-hidroxi dopamina (6-OHDA) como modelo de Parkinson (10-150 μ M) por 24 h. Además, administraron un inhibidor de xCT y para la síntesis de GSH. El efecto neuroprotector del LVT se atribuye al incremento del xCT y de GSH.
- **De Tommaso** y colaboradores en 2005, reportaron que 15 pacientes con la EH fueron tratados con 500 mg-1000 mg de LVT dos veces al día como terapia adicional durante seis meses; 7 pacientes fueron control sin el tratamiento. El LVT redujo los movimientos involuntarios y mejoró la calidad de vida de los pacientes con EH sin presentar efectos adversos severos.
- **Zesiewicz** y colaboradores también en el 2005, reportaron que un hombre con EH que fue tratado con LVT (250-750 mg/día) para reducir la corea, presentó movimientos parkinsonianos y letargia. El paciente había recibido más tratamientos como haloperidol 10 años antes, que le produjo

somnolencia; rasperidol 5 años atrás y produjo letargo; olanzapina causó confusión y somnolencia, en esos cinco años presentó depresión y demencia moderada. Hasta el año de estudio se mantenía medicado con donepezil para la demencia, paroxetina y razodona para la depresión y sueño, furosemida para la hipertensión, oxibutinina para incontinencia urinaria y gabapentina para la enfermedad degenerativa de disco de la espina dorsal. Con estos medicamentos no hubo antecedentes del parkinsonismo. A las seis semanas del tratamiento con LVT redujo la corea significativamente pero desarrolló parkinsonismo y letargia, los cuales desaparecieron a los 7 días de retirar el tratamiento y volvieron los movimientos coreiformes. Los autores especulan que estos síntomas se deben a la inhibición de DA, pero que no existe evidencia para sustentarlo.

Es evidente que se requiere de más estudios que determinen el mecanismo de acción del LVT y concretarlo.

2. JUSTIFICACIÓN

El LVT es un fármaco que reporta el menor porcentaje de efectos adversos y posee un perfil farmacológico diferente. Por lo que al disminuir la actividad eléctrica exacerbada, está preservando la funcionalidad celular sin conocer de manera concreta el porqué. Ya que es necesario esclarecer su mecanismo de acción y el impacto en la epileptogénesis, en los últimos años el estudio relacionado a los FAEs ha crecido de manera considerable con especial enfoque en el LVT y gracias a este tipo de estudios se ha diversificado el conocimiento para sustentar su capacidad como agente neuroprotector. En este trabajo de investigación, se pretende evaluar el efecto neuroprotector ante un ambiente excitotóxico con el fin de contribuir información para esclarecer el mecanismo de acción de este FAE y potenciar su acción terapéutica para mejorar la calidad de vida de los pacientes.

3. HIPÓTESIS

Si el LVT disminuye la actividad eléctrica exacerbada, se espera que en animales administrados con QUIN el fármaco prevenga el daño excitotóxico de la toxina en el tejido estriatal.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto neuroprotector del LVT sobre diferentes marcadores de neurotoxicidad inducida por la infusión intraestriatal de QUIN en ratas.

4.2 Objetivos particulares

- Evaluar el déficit motor inducido por QUIN y el grado de recuperación que aporta el LVT.
- Estimar el efecto del QUIN y del LVT sobre el daño morfológico estriatal mediante la técnica histológica de Hematoxilina–Eosina (H-E).
- Evaluar el daño oxidativo a lípidos y proteínas generado por QUIN y su prevención por LVT.
- Cuantificar la liberación de neurotransmisores que modula el LVT en sinaptosomas estriatales.

5. METODOLOGÍA

5.1 Material biológico

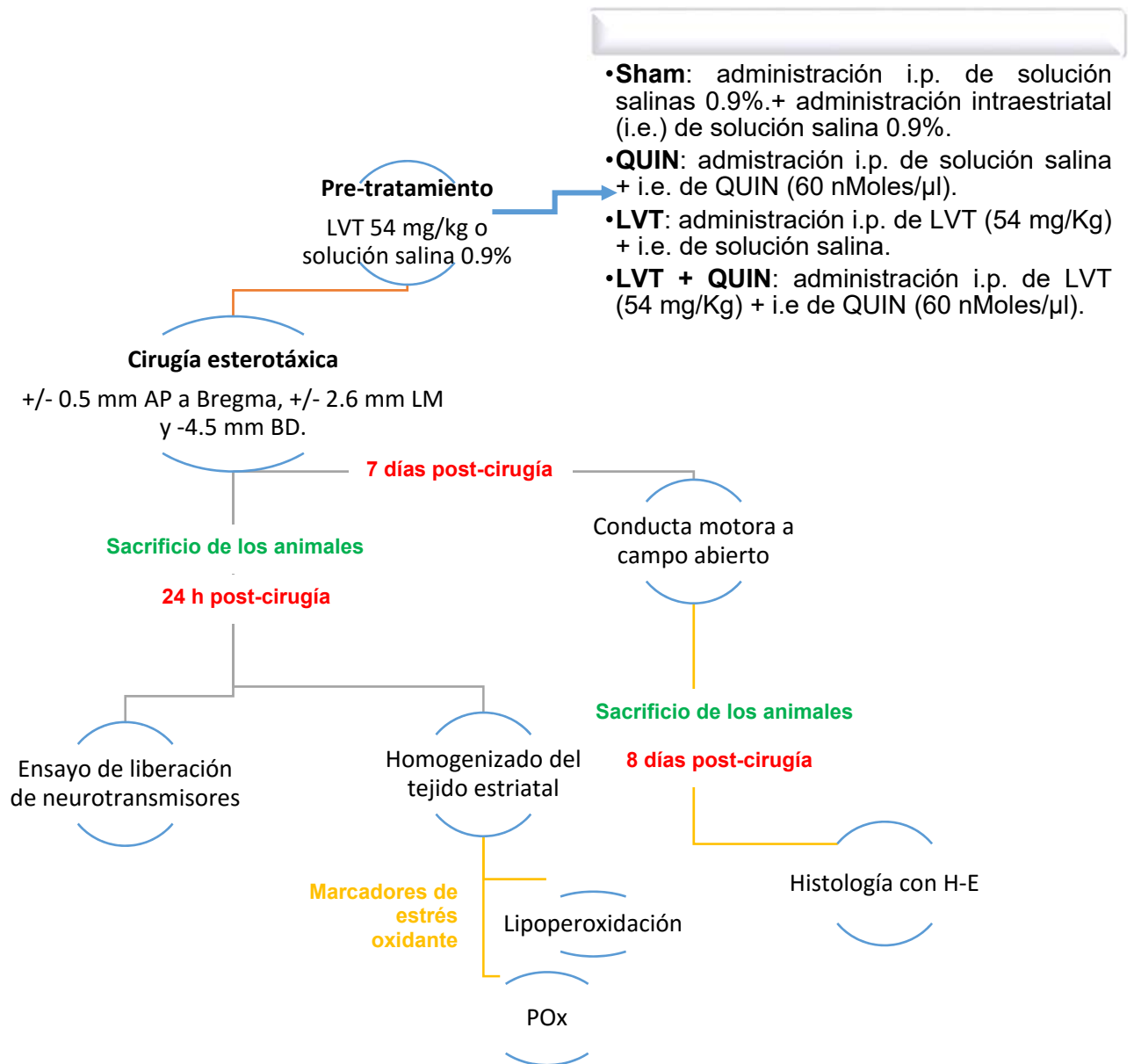
Se utilizaron *Rattus norvegicus* de la cepa Wistar, exclusivamente machos adultos entre 250 – 300 g de peso. Los roedores se obtuvieron del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suarez bajo la aprobación del comité de bioética de dicha institución. Se mantuvieron en cajas plásticas con cama de aserrín estéril, agua y comida (LabDiet 5001) *ad libitum*. Se reguló el período circadiano de 12 horas luz/oscuridad.

5.2 Reactivos

La neurotoxina utilizada para el modelo se preparó desde el inicio del proyecto. Se realizó una solución de QUIN (SIGMA) 60 nMol/ μ L en NaOH 0.1 N a pH 7.4, se hicieron alícuotas, se guardaron a -20°C y se descongeló uno por ensayo. El LVT (AMSA) se preparó al inicio de cada pre-tratamiento; la solución se hizo del comprimido comercial en presentación de 500 mg. La concentración utilizada fue de 54 mg/kg en H_2O destilada. Durante el uso, se guardaba a -4°C . Los demás reactivos se prepararon atendiendo las necesidades de cada experimento.

5.3 Procedimiento experimental

Se establecieron cuatro grupos experimentales: sham, QUIN, LTV Y LVT+QUIN. Cada uno con n=9. Se utilizaron más animales a lo largo del proyecto, debido a la dificultad de la cirugía y a la repetición de ensayos. En la figura 12 se esquematiza de manera general el procedimiento de este trabajo.



- **Sham:** administración i.p. de solución salina 0.9% + administración intraestriatal (i.e.) de solución salina 0.9%.
- **QUIN:** administración i.p. de solución salina + i.e. de QUIN (60 nMoles/ μ l).
- **LVT:** administración i.p. de LVT (54 mg/Kg) + i.e. de solución salina.
- **LVT + QUIN:** administración i.p. de LVT (54 mg/Kg) + i.e de QUIN (60 nMoles/ μ l).

Figura 12: Esquema de la metodología utilizada en este trabajo. Se contó con cuatro grupos experimentales: **sham, QUIN, LVT Y LVT+QUIN**, cada uno con n=4. El pre-tratamiento se realizó durante una semana con un horario estable de 9 – 10 am. Se realizó una administración i.p. de solución salina 0.9% o LVT 54 mg/kg. En el último día de tratamiento, se realizó la cirugía esterotáxica en ambos hemisferios. Al séptimo día, se evaluó la conducta motora al lote destinado a la histología. Los animales se sacrificaron por decapitación a las 24 h y 8 días posteriores a la cirugía y el tejido se destinó a realizar pruebas de estrés oxidante, el ensayo de liberación de neurotransmisores y la histología.

5.4 Pre – tratamiento

El pre-tratamiento se realizó diariamente durante una semana, en un horario matutino de 9 – 10 am. La administración i.p. de LVT 54 mg/kg (Ueda *et al.*, 2009) o solución salina 0.9%. La dosis administrada se obtuvo del peso diario de cada animal y de la siguiente relación:

$$0.3 \text{ kg} = \frac{(54 \text{ mg})}{(1 \text{ Kg})} \frac{(1 \text{ ml})}{(\text{mg de solución LVT})} = \text{ml de LVT}$$

5.5 Cirugía estereotáxica

Se realizó una lesión bilateral intraestriatal en las coordenadas +/- 0.5 mm antero-posterior (AP) a Bregma, +/- 2.6 mm lateral a la línea media (LM) y - 4.5 mm bajo la dura madre (BD) (Paxinos y Watson, 1998).

Se anestesió a cada animal con pentobarbital sódico (0.2 ml/0.25 kg de peso); se estableció un umbral nociceptivo es decir, se aplicó una fuerza mínima en una de las patas trasera para generar un movimiento e indicar que el animal percibe dolor. Hasta la ausencia de respuesta del estímulo, el animal se colocó en el equipo. Se realizó una incisión antero–posterior en el cráneo, se limpió el hueso con hisopos estériles y H₂O₂; con ayuda de una jeringa Hamilton se ubicó en Bregma para ajustar las coordenadas; se marcó el punto de interés y se realizó el trépano con ayuda de un micromotor dental y una fresa de acero inoxidable previamente esterilizado. La administración fue de un µL de QUIN en cada estriado, se esperó 3 minutos para difundir el volumen y retirar la microjeringa. Se regresó la aguja a Bregma para ubicar el segundo estriado y repetir el mismo procedimiento.

Una vez retirada la aguja se desmontó al animal del equipo, se limpió la zona de incisión con solución salina y gentamicina 1:2 para evitar infecciones, se suturó la incisión, se colocó en una caja con aserrín limpio y una lámpara de luz incandescente al interior para generar calor y optimizar su recuperación.

5.6 Conducta motora en campo abierto

La prueba conductual se realizó siete días posteriores a la cirugía estereotáxica a las 9 am. Cada animal fue aislado de cualquier factor externo que alterara su comportamiento (oscuridad total y sin perturbaciones de sonido). El equipo consta de una caja de acrílico oscuro con tapa, monitoreada por sensores que registran el movimiento del animal con el *software* VersaMax. Antes de iniciar cada prueba, se limpió el suelo de la caja con alcohol al 70% y se monitoreó el comportamiento en un temporal de 15 minutos (5, 10 y 15 minutos).

5.7 Eutanasia

Los animales se sacrificaron por decapitación de manera rápida y efectiva con ayuda de una guillotina de uso veterinario para roedores.

5.8 Histología con Hematoxilina-Eosina

Los animales destinados al lote histológico, se sacrificaron a la semana de la cirugía, un día posterior a la evaluación de la conducta motora. Se anestesió a cada animal con una dosis letal de pentobarbital sódico (50 unidades) independientemente del peso. Se realizó una perfusión intracardiaca con p-formaldehído al 4% para fijar el tejido. Se extrajo el encéfalo y se dejó en p-formaldehído tres días más para

optimizar el proceso de fijación. Posteriormente, el tejido se deshidrató en soluciones a diferentes concentraciones: agua destilada, alcohol etílico del 60% al 100%, alcohol-xilol y xilol. Después se colocaron en un carril de parafina para incluirlos.

Los cortes se realizaron en el micrótopo a 5 µm de grosor. Una vez obtenidos los cortes en portaobjetos, se realizó la tinción con H-E. Se obtuvieron micrografías de los cortes en el microscopio Nikon ECLIPSE E200 (DiaMedical USA, West Bloomfield, MI) con el software Q-capture Pro 7. Los resultados se presentan como el porcentaje de daño celular obtenido por campo.

5.9 Homogenizado de tejido estriatal

El lote de animales destinado para pruebas bioquímicas se sacrificó por decapitación 24 horas posteriores a la cirugía. Se extrajeron ambos estriados; el estriado derecho se destinó para pruebas bioquímicas y el estriado izquierdo para el ensayo de liberación en sinaptosomas (Posteriormente descrito). El primero se homogenizó en 500 µl de buffer de lisis, se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se desechó el pellet y el sobrenadante se dividió de la siguiente manera: 250 µl (proteínas oxidadas), 50 µl (peroxidación de lípidos) y el restante para cuantificar proteínas por método de Lowry. Las alícuotas se guardaron a -20°C hasta su uso.

5.10 Obtención de sinaptosomas estriatales

Como ya se mencionó en el apartado anterior, el estriado izquierdo se destinó para el ensayo *ex vivo* de liberación de neurotransmisores; así que el tejido se procesó

inmediatamente después de su extracción. Se colocó en un tubo homogenizador en hielo; se adicionaron 200 µl de buffer HEPES-sacarosa y se homogenizó al ejercer presión manualmente de 10 a 12 veces; el volumen resultante se trasladó a un tubo Eppendorf para centrifugar a 1000 g por 10 minutos a 4°C; se tomó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 17000 g por 10 minutos a 4°C, esta vez se recuperó el pellet y se resuspendió en 200 µl de buffer HEPES y se realizó el ensayo de liberación.

5.11 Ensayo de liberación de neurotransmisores

Para validar este ensayo, se realizó una prueba con estímulo de KCl como inductor despolarizante para confirmar que se liberan neurotransmisores en los botones sinápticos (sinaptosomas). Los sinaptosomas se incubaron durante 30 minutos a 37°C en agitación para acondicionarlos; a cada grupo se administró KCl o buffer hepes de acuerdo a la siguiente relación:

$$V_{\text{KCl } 1\text{M}} = \frac{(25 \text{ mM})(\text{vol. sinaptosomas } \mu\text{l})}{1000 \text{ mM}}$$

$$V_{\text{buffer}} = \frac{(25 \text{ mM})(\text{vol. sinaptosomas } \mu\text{l})}{1000 \text{ mM}}$$

Posteriormente, se centrifugaron a 17000 xg por 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante, el cual se dividió en dos juegos cada uno para cuantificar niveles de DA. Las muestras se pusieron en refrigeración a -20°C hasta su análisis. Se realizaron ensayos en paralelo como control, para validar el protocolo. Una vez confirmado el ensayo, se dividieron en dos grupos para cuantificar Glu y DA.

5.12 HPLC para DA

Las muestras se procesaron por análisis cromatográfico de alta definición (HPLC). Se empleó un cromatógrafo Perkin-Elmer LC-250 con un detector electroquímico Metrohm. Los picos de señal se integraron con una estación de datos Perkin-Elmer Sigma y se construyó una curva de calibración para DA con metabisulfito perclórico. Se utilizó una columna C18 Alltech 100 (100 x 3 mm) para el análisis cromatográfico. La concentración de DA se obtuvo por interpolación contra su correspondiente curva estándar. Los resultados se presentan como la relación de μg del neurotransmisor entre los μL de proteína.

5.13 HPLC para Glu y GABA

Las muestras se desproteinizaron con ácido perclórico, se neutralizaron con carbonato de potasio, y se procesaron en una centrifuga a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 ° C. El sobrenadante se recogió y analizó por cromatografía líquida de alto rendimiento. Las muestras se derivatizaron con oftalaldehído/mercaptoetanol y se inyectaron en una columna OPA de Adsorbefera HS (100 × 4,6 mm), una bomba cuaternaria Alltech Associates (Serie 1100, Agilent Tecnologías). La fase móvil consistió en un acetato (AcO, 50 mmol/L, pH 5,9) con tetrahidrofurano y metanol absoluto a un caudal de 1,5 ml/min. El programa de disolventes consistió en una elución isocrática (0-5 minutos) y una elución lineal (5-27 minutos): tetrahidrofurano 1%, 0-27 minutos; AcO 89%, 0-5 minutos, y 89% -77%, 5-27 minutos; Metanol absoluto al 10%, 0-5 minutos y 10%-22%, 5-27 minutos. Las señales se registraron a una excitación de 232 nm y longitudes de onda de emisión de 455 nm. El análisis

se realizó con el *software* ChemStation 10.02 (Agilent Tecnologías). Los datos se graficaron de la relación de μg del neurotransmisor entre los μL de proteína.

5.14 Peroxidación lipídica

Para este ensayo se utilizaron los tubos de 50 μl que separamos del homogenado estriatal. A cada muestra se añadió 100 μl de TBA (Ácido Tiobarbótico); se incubaron a 96°C durante 20 minutos (hasta el vire rosa), y posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 532 nm en el lector de microplaca *Cytation*^R. Los resultados se presentan como los nmol de aldehídos reactivos entre los mg de proteína.

5.15 Proteínas Oxidadas

Un día antes de realizar el experimento, a cada muestra se adicionaron 50 μl de sulfato de estreptomicina (10 mg/100 ml de H₂O destilada), se agitaron y guardaron a 4°C. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se tomó el sobrenadante y se añadieron 300 μl de dinitrofenilhidrazina (DNPH) (0.05 g DNPH/ 25 ml HCl 2.5 N), se agitaron y mantuvieron en oscuridad total durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 300 μl de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, se agitaron y centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el *pellet*. A este se le adicionaron 300 μl de TCA al 10%, se resuspendió, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recuperó nuevamente el *pellet*. Al *pellet* se realizó un lavado con alcohol isopropílico. A partir de este punto, el procedimiento se repitió un total de tres veces.

Después se registró la densidad óptica en el lector de placas *Cytation^R* a 280 y 370 nm. Los resultados se representan como la relación de nmol de DNPH entre los mg de proteína.

5.16 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa estadístico *GraphPad Prims* 6. Para determinar las diferencias entre grupos, primero se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni o Tukey; y al ensayo control de liberación de DA, se realizó una prueba *t* de *student*. Se consideró como diferencia significativa a una $p < 0.05$; los datos se graficaron con el error estándar para observar la distribución muestral.

6. RESULTADOS

6.1 El pre-tratamiento con LVT previno las alteraciones motoras causadas por la administración de QUIN

El equipo considera un temporal de tres tiempos: a los 5, 10 y 15 minutos. Se muestran únicamente los datos obtenidos a los 10 minutos ya que a los 5 minutos no hay diferencia significativa y a los 15 minutos se presentó un proceso de habituación. En la Figura 13 observamos que los animales tratados con QUIN denotan una conducta hipocinética (30.675 ± 12.28) si lo comparamos con el grupo sham (111.4 ± 12.28), se redujo la actividad motora casi un 70%. Por el contrario, los animales tratados únicamente con el fármaco no tuvieron diferencia significativa en la actividad comparado contra el grupo sham (137 ± 11.58). Por último, los animales con ambos tratamientos (QUIN+LVT) tuvieron una recuperación estadísticamente significativa de la actividad motora (98.08 ± 11.58) con respecto a la hipoactividad que provocó la toxina QUIN.

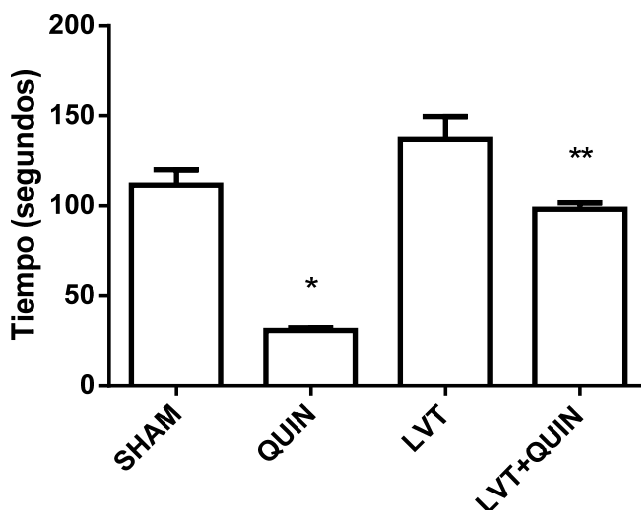


Figura 13. El efecto del LVT en el tiempo en movimiento de los animales sobre la administración i.e. de QUIN. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía ($F=26.46$), seguida de un análisis post-hoc de comparación múltiple de Bonferroni. Sham $n=5$, QUIN $n=4$; LVT $n=5$ y LVT+QUIN $n=5$. Diferencia significativa entre *QUIN vs Sham y **LVT+QUIN vs QUIN.

Esta prueba evaluó el número total de movimientos que el animal realizó durante 10 minutos; se consideraron movimientos horizontales y verticales a lo largo del dispositivo (Figura 14). El grupo con QUIN continúa la tendencia de hipocinesia (39 ± 4.5) que se observó en el registro de actividad del tiempo en movimiento, al disminuir con respecto al grupo sham (59 ± 4.5). Los animales administrados únicamente con LVT tuvieron una actividad similar al grupo sham sin presentar una diferencia significativa (61 ± 4.5); mientras que los animales con el fármaco en presencia de QUIN recuperaron la actividad motora que la toxina provocó (57 ± 4.5), similar al grupo sham.

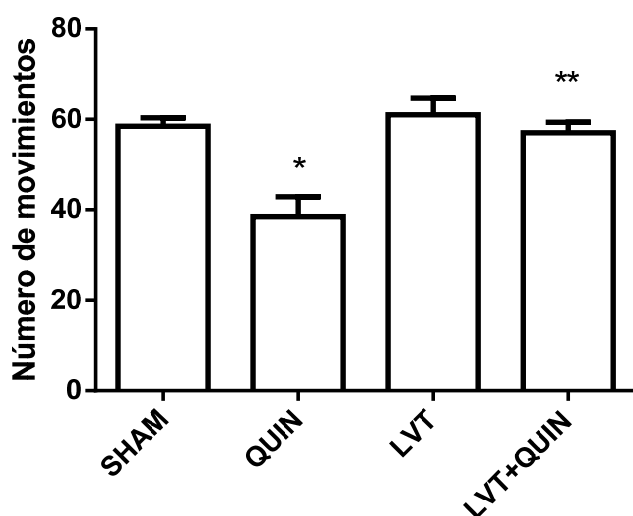


Figura 14. El efecto del LVT en el número de movimientos de los animales sobre la administración i.e. de QUIN. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía ($F=10.10$), seguida de un análisis post-hoc de comparación múltiple de Bonferroni. Sham $n=4$, QUIN $n=4$; LVT $n=4$ y LVT+QUIN $n=4$. Diferencia significativa de *Sham vs QUIN y **LVT+QUIN vs QUIN.

6.2 El tratamiento con LVT previene las alteraciones morfológicas causadas por la administración de QUIN

La tinción con H-E y la gráfica representan el estado celular de los diferentes tratamientos en el cuerpo estriado (Figura 15 y 16). El grupo sham presenta el 26% de población celular con daño, un porcentaje que se considera como un estado basal de muerte. Observamos que la toxina QUIN presenta el 99.09% de células con daño en estado necrótico por la marcada coloración basófila de los núcleos. El grupo de tratamiento solamente con el fármaco, muestra un porcentaje de daño del 32% con diferencia significativa con el porcentaje basal del grupo sham. Finalmente en el último grupo de pre-tratamiento del LVT con QUIN, observamos la tendencia a disminuir el daño celular con respecto al grupo de la toxina, lo que representa el 29% de células muertas sin diferencia estadística al porcentaje del grupo sham.

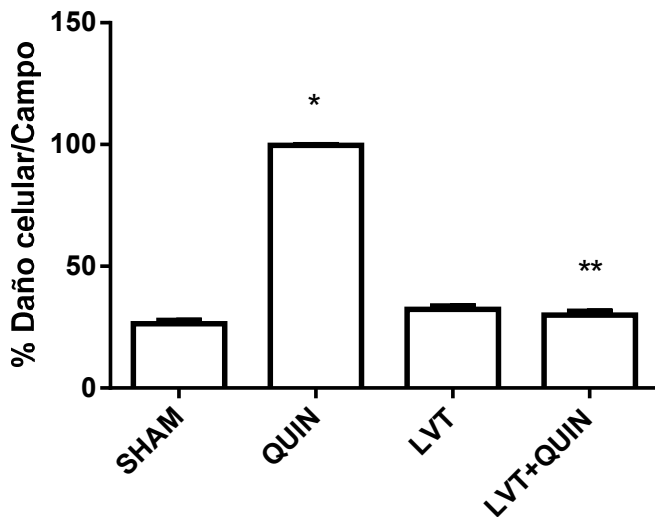


Figura 15. El pre-tratamiento con LVT previno el daño morfológico provocado por el QUIN.

Grupo sham n=4; QUIN n= 4; LVT n=6 y LVT+QUIN n=4. Se realizó ANOVA de una vía (F= 702.5) seguida de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

Diferencia significativa de *Sham vs QUIN y ** QUIN vs LVT+QUIN.

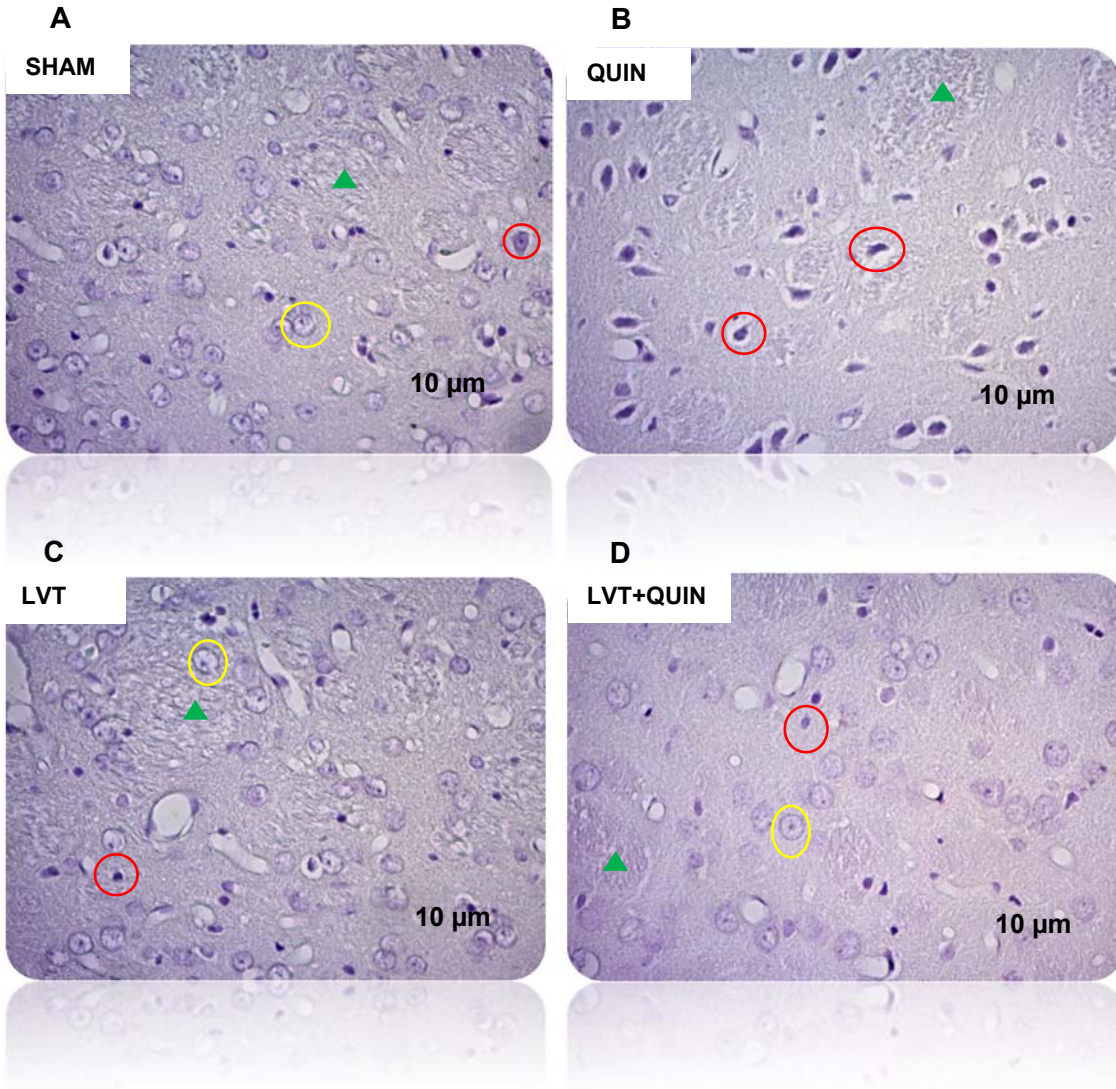
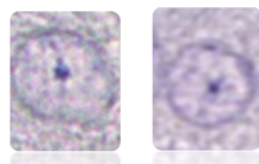
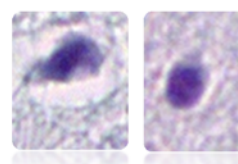


Figura 16. Cortes coronales del encéfalo de ratas en los distintos grupos de tratamiento, teñidos con H-E. A: Sham, B: QUIN (60 nmol); C: LVT (54 mg/kg) y D: LVT+QUIN. En la figura E se muestra una ampliación de la morfología celular para considerar a una célula sin daño (círculo amarillo) de una célula necrótica (círculo rojo) y el triángulo de color verde señala un estrioso, característico de la región estriatal.



Células sin daño

E



Células necróticas

6.3 El estímulo despolarizante con KCl favorece la liberación ex vivo de neurotransmisores en sinaptosomas estriatales

Este primer ensayo se realizó como control para validar los sinaptosomas estriatales como modelo de liberación de neurotransmisores. Como se muestra en la Figura 17, se analizaron dos grupos control: sham con buffer HEPES (0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y sham con el estímulo de KCl (25mM) (0.06 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Se observó que con el estímulo despolarizante la concentración de DA que se libera es mayor, lo que corroboró la validez del ensayo para continuar con la cuantificación como se muestran más adelante.

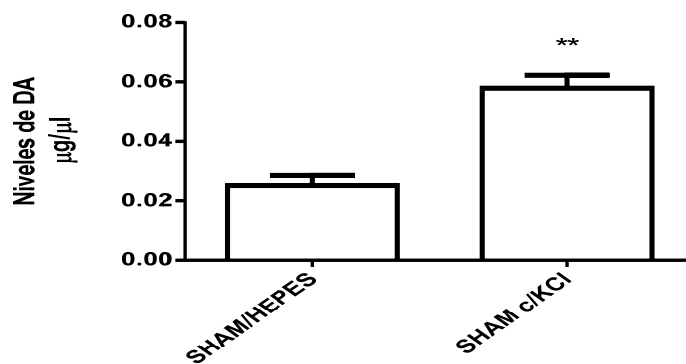


Figura 17. La liberación de DA en sinaptosomas estriatales se favorece con el estímulo despolarizante. Ambos grupos cuentan con una $n=4$. Se realizó el estadístico “t” de student.

** Diferencia significativa de sham con KCl respecto a sham sin estímulo de KCl.

La Figura 18 representa los niveles de DA liberados en sinaptosomas de animales administrados con solución salina, LVT, QUIN o la combinación. La gráfica no representa los resultados obtenidos del grupo con LVT ya que el bajo número de animales (2) no permitió realizar el análisis. El ensayo muestra que en presencia de QUIN (60 nmol) se disminuye la liberación de DA (0.013 ± 0.004) comparado con los 0.025 ± 0.004 del grupo sham. En presencia del LVT y la toxina, la liberación del neurotransmisor se recuperó significativamente a 0.025 ± 0.004 .

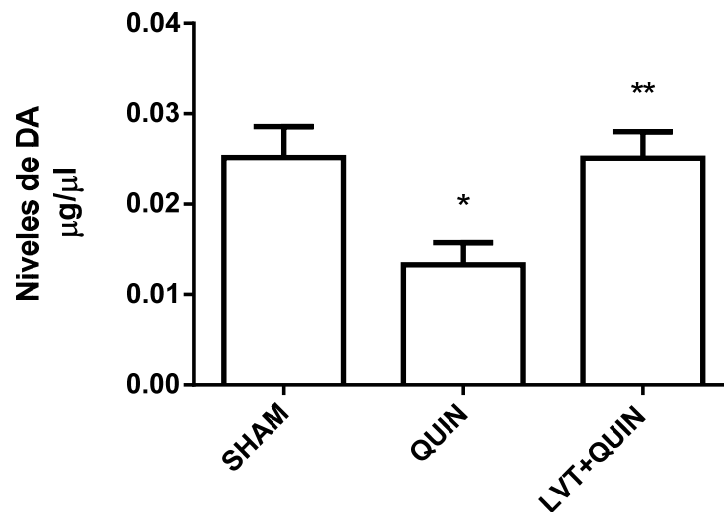


Figura 18. El pre-tratamiento con el antiepiléptico previene la disminución del aporte dopaminérgico al tejido estriatal sinaptosomas. Sham n=4; QUIN y LVT+QUIN n=5. Se realizó ANOVA de una vía ($F=5.618$) seguido de una prueba post-hoc de Tukey. *Diferencia significativa de Sham vs QUIN; **Diferencia significativa de LVT+QUIN vs QUIN.

En la Figura 19 se observa de manera considerable el incremento en la liberación del Glu en el grupo que recibió solamente la administración i.e. de QUIN (76 ± 6.6), lo que representa una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo sham (34 ± 6.6). Sin embargo, cuando los animales recibieron únicamente la administración del fármaco la liberación de Glu disminuye significativamente con respecto al grupo sham (7 ± 6.6). La actividad del LVT se modifica cuando se administra en presencia de la toxina al reducir la liberación del aminoácido excitador con diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo QUIN (16 ± 6.6).

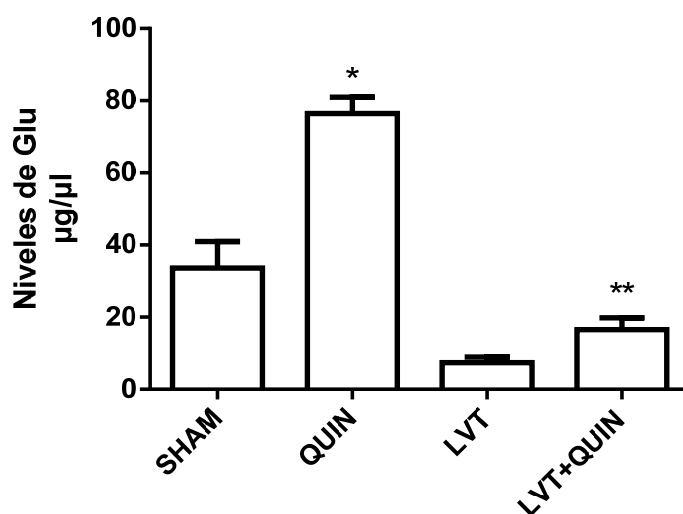


Figura 19. El LVT reduce la liberación de Glu provocada por el QUIN. Todos los grupos cuentan con $n=4$. Se realizó una ANOVA de una vía ($F=42.86$), seguido de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni. *Diferencia significativa del grupo QUIN respecto al grupo sham y **Diferencia significativa del grupo de LVT+QUIN respecto al grupo QUIN.

La Figura 20 representa la liberación del principal aminoácido inhibidor del SNC. Se observa que el grupo con la toxina inhibe la liberación (37) de GABA significativamente respecto al grupo sham (154). En el grupo con LVT (125), los niveles se mantienen cercanos al grupo sham ya que no hay un evento causal para modificar su concentración. Lo relevante en este ensayo, es que se observa que en el grupo de LVT+QUIN el GABA incrementa su presencia en el espacio sináptico (208) para contrarrestar el aporte glutamatérgico que el QUIN provocó.

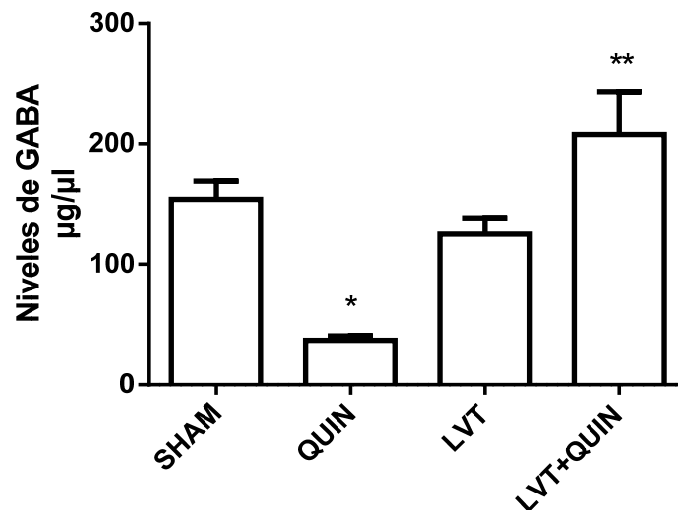


Figura 20. Cuantificación de la liberación de GABA en sinaptosomas estriatales. Sham n=5, QUIN n=4, LVT n=8 y LVT+QUIN n=9. Se realizó una ANOVA de una vía ($F=10.06$), seguido de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni. **Diferencia significativa del grupo LVT+QUIN respecto al grupo QUIN.

6.4 El pre-tratamiento con LVT reduce los marcadores de estrés oxidante

El malondialdehído (MDA) se produce en respuesta del daño a lípidos por el estrés oxidativo: a mayor concentración de MDA en el tejido estriatal mayor daño lipídico se genera a causa del evento excitotóxico por parte del QUIN. En la Figura 21 el grupo sham presentó niveles de daño a lípidos de (2.3 nmol); como es de esperarse, la neurotoxina fue el grupo con un mayor daño a lípidos con (3.1 nmol). El fármaco como pretratamiento sin la presencia de la toxina, produjo (2 nmol), sin diferencia estadística comparado con el grupo sham. Cuando se administró LVT en presencia de QUIN el valor de concentración de MDA disminuyó a (1.9 nmol), lo que sugiere un efecto protector del fármaco.

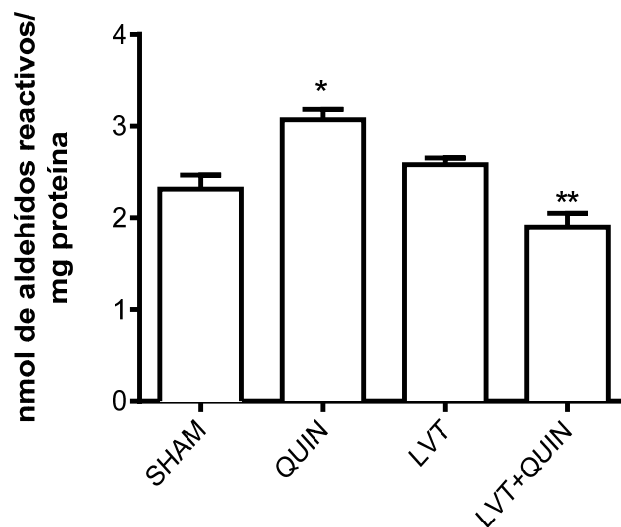


Figura 21. Efecto del LVT en los niveles de peroxidación lipídica en el estriado de animales administrados con QUIN. Sham n=3, QUIN n=4, LVT n=4 y LVT+QUIN n=3. Se realizó una ANOVA de una vía (F=16.62), con una prueba post-hoc Bonferroni. Diferencias significativa de *Sham vs QUIN y **QUIN vs LVT+QUIN.

Por su parte, los grupos carbonilo se generan por la proteólisis de radicales •OH y para su detección se utiliza el DNPH como marcador de proteínas oxidadas. En presencia de QUIN, la concentración es significativamente mayor al del grupo sham (4.3 vs 6.4 nMoles de DNPH/mg de proteína); los animales que se administraron solamente con el LVT también presentan un daño oxidativo (6.4 nMoles de DNPH), pero en presencia de ambos tratamientos (LVT+QUIN) el daño a proteínas se previene en valores de 4.5 nMoles de DNPH (Figura 22)

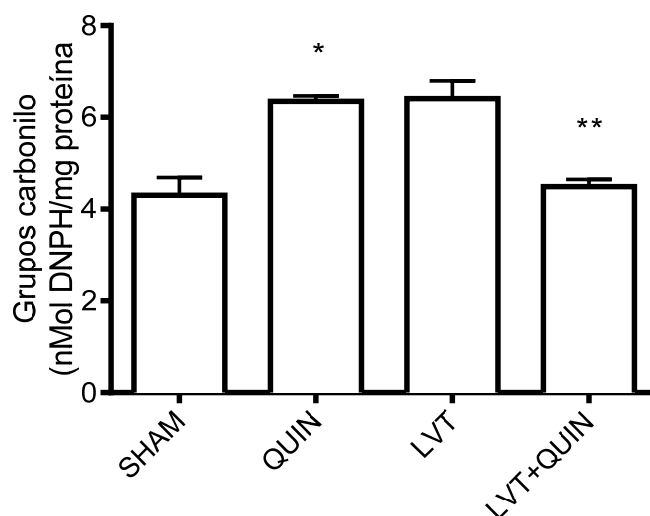


Figura 22. Se observa el daño oxidativo a proteínas. Cada grupo cuenta con una n= 4. Se realizó una ANOVA de una vía ($F=15.65$), seguido de una prueba post-hoc de Tukey.

* Sham vs QUIN y ** QUIN vs LVT+QUIN.

7 DISCUSIÓN

Este trabajo se enfocó en evaluar el efecto neuroprotector que ejerce el LVT ante un ambiente excitotóxico. La hipótesis sugiere que el LVT modularía la liberación de neurotransmisores para contrarrestar este efecto tóxico del QUIN en el tejido estriatal. Los resultados obtenidos sugieren que el LVT protege el tejido y la funcionalidad celular del cuerpo estriado ya que modula la liberación de diferentes neurotransmisores: en el caso del Glu se inhibe la liberación; para potenciar este efecto de inhibición excitatoria, el GABA incrementa su presencia y los niveles de DA también incrementan para contrarrestar las alteraciones motoras que el QUIN provocó.

La primera aproximación por observar si el LVT podría ser un agente neuroprotector, fue la histología. Se observa que la excitotoxina produjo alteraciones morfológicas en la región estriatal, como se reporta en Pérez-Severiano *et al.*, 2004. Ellos utilizaron una dosis elevada de QUIN de 240 nmol/ μ l, donde observaron núcleos hipercromáticos y con deterioro del neuropilo. Nuestros datos histológicos demuestran que la morfología celular presenta un estado de picnosis sin alteraciones en el neuropilo. Esto se debe a que la dosis utilizada permite que la baja concentración de QUIN actúe de manera focalizada sin dañar la citoarquitectura. Por otro lado, en los animales con pre-tratamiento de LVT y la inyección intraestriatal de la toxina, se observa que el fármaco revierte el daño provocado por el QUIN, un estado tisular similar al grupo sham. Hasta ahora los reportes que le atribuyen un efecto neuroprotector al LVT, no brindan algún tipo de información tisular por lo que nuestros resultados representan información

novedosa. Este primer acercamiento de neuroprotección, dio hincapié para continuar con la investigación.

La actividad motora en campo abierto se empleó como parámetro para evaluar la capacidad motriz y el comportamiento exploratorio de los animales como evidencia funcional del tejido estriatal en los diferentes grupos de tratamiento. Nuestros resultados demuestran una inducción de actividad por parte del QUIN sobre el movimiento, ya que produce alteraciones motoras de tipo hipocinético. Algunos reportes en la literatura mencionan que la lesión bilateral con 300 nmoles de QUIN induce alteraciones motoras de tipo hipercinético y cambios cognitivos característicos de la EH en una etapa temprana (Scattoni *et al.*, 1994). Esta aseveración sugiere que el tejido aún preserva células funcionales las cuales podrían tener la capacidad de comunicarse para concretar el movimiento. Sin embargo, los resultados histológicos muestran: un escenario tisular estriatal donde el 99.09% de la población celular está deteriorada y en un proceso de muerte, no existen células capaces de realizar la comunicación sináptica adecuada para la iniciación y ejecución del movimiento, por lo que genera un patrón hipocinético.

De acuerdo a lo reportado por Zesiewicz *et al.* en 2005, un paciente que fue medicado con LVT para tratar la corea de la EH presentó movimientos parkinsonianos a las seis semanas del tratamiento. Ellos argumentan que dicha alteración se produjo por la interacción de fármacos entre el LVT y el donepezil, un inhibidor reversible de la acetilcolinesterasa, y no por efecto del LVT. Los datos que se obtuvieron de la conducta de animales que fueron administrados únicamente con el fármaco, respaldan dicho argumento: el fármaco provocó ningún tipo de alteración conductual, sin representar una diferencia estadísticamente significativa con el

grupo sham. Los animales con QUIN que recibieron el pre-tratamiento con LVT, recuperaron la capacidad de movimiento similar al grupo sham.

En relación al proceso de exocitosis, el LVT tiene un amplio efecto sobre múltiples sistemas de neurotransmisión a nivel presináptico, actúa sobre la proteína vesicular 2A y su acción se acentúa de manera selectiva sobre la actividad neuronal anormal (De Tommaso et al., 2005). Al considerar lo que De Tommaso habla, no podríamos hacer una aseveración específica de su modulación. Crevecoeur y colaboradores en 2014, afirman que en el hipocampo de pacientes con epilepsia de lóbulo temporal (TLE) presentaron una disminución en la expresión de SV2A; Estrada et al., 2016 mencionan que la reducida expresión de SV2A conlleva a una mayor excitabilidad, por lo tanto a una susceptibilidad convulsiva. Estos artículos aunados a los resultados obtenidos en este trabajo, nos abren la puerta para sugerir que la SV2A modula la liberación de GABA para que inhiba la excitación y que a la par, existe una modulación negativa para no liberar Glu.

Se observa que en presencia del LVT la liberación del GABA incrementa y el glutamato disminuye. Tal parece que ante un escenario donde perdura la excitabilidad provocada por el QUIN, la SV2A tiende a liberar el neurotransmisor que mitigue este evento y a no promover la liberación de uno que lo potencie. Pero esta modulación no es excluyente. Cuando hay muerte neuronal en el estriado, provoca la pérdida de comunicación con la sustancia negra y por lo tanto una disminución de DA proveniente de dicha región. Al restaurar la presencia de la DA en el cuerpo estriado, se recupera la funcionalidad del sistema motor. Esto se debe a que al ser el estriado y la sustancia negra dos componentes de los ganglios

basales para realizar movimientos voluntarios, se recuperó la integridad neuronal para que la neurotransmisión dopaminérgica ejerza su acción en el estriado y por lo tanto, un control adecuado de la actividad motora.

Por su parte, los marcadores de estrés oxidante que presentamos en este trabajo (peroxidación lipídica y POx: carbonilación de proteínas) demuestran que el LVT previene el daño oxidativo inducido por el QUIN, por lo que se sugiere un papel antioxidante de manera directa o indirecta, por su capacidad de inhibir los marcadores de daño oxidativo. El efecto neuroprotector ante la peroxidación de lípidos en la corteza y el diencefalo fue reportado por Marini et al. en 2004, pero los autores desconocían el posible mecanismo por el que se lleve a cabo. En este trabajo se presenta evidencia novedosa de la modulación que ejerce el LVT. Aunque la literatura (Miyazaki *et al.* en 2015) sugiere que el perfil anti-oxidante del LVT se debe al incremento en la expresión del transportador xCT y al incremento de los niveles de GSH; ellos presentan un modelo parkinsoniano con 6-OHDA en cultivos de astrocitos, y hablan acerca del GSH como un sistema enzimático anti-oxidante que depende del transportador, el cual va a proporcionar el sustrato (cistina) para la síntesis de la enzima y así mitigar el desequilibrio oxidante.

Esta sugerencia anti-oxidante del LVT, podemos observarla desde la estructura química del fármaco (figura 14). La molécula tiene tres grupos que donan electrones para los radicales libre y un grupo que le confieren la captación de electrones libres, por lo tanto la habilidad anti-oxidante.

8. CONCLUSIÓN

Los hallazgos de este trabajo sugieren que la administración de LVT 54mg/kg como pre-tratamiento aporta efectos benéficos al tejido estriatal como: a) **neuroprotector**, ayuda a preservar el tejido estriatal del evento excitotóxico al que estuvo sometido; b) como **anti-oxidante** al reducir el daño oxidativo a proteínas y lípidos y prevenir la muerte neuronal; y c) como **antidiscinético**, ya que se observó una notable recuperación del movimiento de los animales ante una alteración motora. Por lo que este perfil neuroprotector no solo demuestra que podría evitar el deterioro progresivo de la epilepsia, sino que también amplía su espectro de acción terapéutico al minimiza el daño celular y preservar la funcionalidad tisular. Se requiere un estudio más detallado para concretar si los mecanismos descritos por la literatura actúan de manera conjunta para hacer de este antiepiléptico un fármaco con un amplio perfil terapéutico.

9. Perspectivas

- Determinar mediante un estudio de regulación génica el grado de expresión de la SV2A y del transportador xCT para concretar el mecanismo neuroprotector del LVT.
- Cuantificar las ERO/ERN para demostrar la capacidad anti-oxidante del LVT.

10. BIBLIOGRAFÍA

- ✚ **Abdel-Wahab BA**, Shaikh IA, Khateeb MM and Habeeb SM (2015). Omega 3 Polyunsaturated Fatty acids enhance the protective effect of levetiracetam against seizures, cognitive impairment and hippocamal oxidative DNA damage in young kindled rats. *Pharmacol, Biochem and Beh* 135:105 –113

- ✚ **Bahena-Trujillo R**, Flores G y Arias-Montaña JA (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biomed* 11:39-60. Puebla, México. Disponible en línea, consultado el 26 de diciembre de 2017: <http://www.fisio.buap.mx/online/2000-4.PDF>

- ✚ **Beadle GW**, Mitchell HK and Nyc JF (1947). Kynurenine as an intermediate in the formation of nicotinic acid from tryptophane by neurospora. *Proc Natl AcadSci* 33:155–8.

- ✚ **Bohár Z**, Toldi J, Fülöp F and Vécsei L (2015). Changing the Face of Kynurenines and Neurotoxicity: Therapeutic Considerations. *Int. J. Mol. Sci* 16: 9772-9793.

- ✚ **Böhme I**, Lüddens H (2007). Zielstrukturen für antiepileptika: molekulare neurobiology der epilepsie. *Pharm. Unserer Zeit* DOI:10.1002/pauz.200600224.

- ✚ **Brunton LL**, Lazo Js and Parker KL (2007). Las bases farmacológicas de la terapéutica de Goodman y Gilman. 11ª edición, Editorial McGrawHill.

- ✚ **Cabo-de la Vega C**, Villanueva-Hernández P and Prieto-Martín A (2006). Neuroquímica de la epilepsia, neurotransmisión inhibitoria y modelos experimentales: nuevas perspectivas. *Rev Neurol* 42 3: 159-168.

- ✚ **Colin-Gonzalez AL**, Maldonado PD and Santamaria A (2013). 3-Hydroxykynurenine: an intriguing molecule exerting dual actions in the central nervous system. *Neurotoxicol* 34:189–204.

- ✚ **Cortes-Altamirano JC**, Olmos-Hernández A, Bonilla-Jaime H, Bandala C, González-Maciel A and Alfaro-Rodríguez A (2016). Levetiracetam as an antiepileptic, neuroprotective, and hyperalgesic drug. *Neurol India* 64:1266-75.

- ✚ **Cortes-Romero C**, Galindo F, Galicia-Isasmendi S y Flores A (2011). GABA: ¿dualidad funcional? Transición durante el neurodesarrollo. *Rev Neurol* 52: 665-75.

- ✚ **Crevecoeur J**, Kaminski RM, Rogister B, Foerch P, Vandenplas C, Neveux M, Mazzuferi M, Kroonen J, Poulet C, Martin D, Sadzot B, Rikir E, Klitgaard H, Moonen G and Deprez M. (2014). Expression pattern of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms in patients with temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40:191 –204.

- ✚ **De Tommaso M**, Di Fruscolo O, Scirucchio V, Specchio N, Cormio C, De Caro MF and Livrea P (2005). Efficacy of Levetiracetam in Huntington Disease *Clin Neuropharmacol* 28:280–284.

- ✚ **Di Paola ED**, Pietro Gareri , Davoli A , Gratteri S, Scicchitanoa F , Naccari C and De Sarro G (2007). Influence of levetiracetam on the anticonvulsant efficacy of conventional antiepileptic drugs against audiogenic seizures in DBA/2 mice. *Epilep Res* 75:112-121.

- ✚ **Dorado Martínez C**, Rugerio Vargas C y Rivas Arancibia S (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. Rev Fac Med UNAM Vol.46 No.6 Noviembre-Diciembre.

- ✚ **Engelborghs S**, D'Hooge R and Dedeyn PP (2000). Pathophysiology of epilepsy. Acta neurol belg 100: 201-213.

- ✚ **Flores-Soto ME**, Chaparro-Huerta V, Escoto-Delgadillo M, Vazquez-Valls E, González-Castañeda RE and Beas-Zarate C (2012). Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. Neurología 27 5:301-310.

- ✚ **SC Ghasemi M and Schachter** (2011). The NMDA receptor complex as a therapeutic target in epilepsy: a review. Epilep & Beh 22: 617–640.

- ✚ **Gibbs JE and Cock HR** (2007). Administration of Levetiracetam after prolonged status epilepticus does not protect from mitochondrial dysfunction in a rodent model. Epilep Res 73: 208-212.

- ✚ **Góngora-Alfaro JL** (1990). Mecanismo de acción de la Dopamina y sus análogos farmacológicos en el control de la actividad motora regulada por los Ganglios Basales. Rev Biomed, Vol 1, No. 2: Abril-junio. Mérida, México. Disponible en línea, consultado el 12 de octubre de 2016: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb90124.pdf>

- ✚ **Gouliaev AH and Senning A** (1994). Piracetam and other structurally related nootropics. Brain Res Rev 19 2:180-222.

- ✚ **Guillemin GJ**, Cullen KM, Lim CK, Smythe GA, Garner B, Kapoor V, Takikawa O and Brew BJ (2007). Characterization of the kynurenine pathway in human neurons. *J Neurosci.* 27 47: 12884-12892.

- ✚ **Haines DH** (2003). *Principios de Neurociencia*, capítulo 26: Núcleos basales. pp. 405-418. 2ª edición. Madrid, España.

- ✚ **Jhamandas KH**, Boegman RJ, Beninger RJ, Miranda AE and Lipic KA (1999). Excitotoxicity of quinolinic acid: Modulation by endogenous antagonists. *Neurotox Res* 2: 139-155.

- ✚ **Jones SP**, Guillemin GJ and Brew BJ (2013). The kynurenine pathway in stem cell biology. *Int. J. Tryptophan Res* 6: 5766.

- ✚ **Kaminski RM**, Matagne A, Leclercq K, Gillard M, Michel F, Kenda B, Talaga P and Klitgaard H. (2008). SV2A protein is a broad-spectrum anticonvulsant target: Functional correlation between protein binding and seizure protection in models of both partial and generalized epilepsy. *Neuropharmacol* 54: 715 e720.

- Krause D**, Suh HS, Tarassishin L, Cui QL, Durafourt BA and Choi N (2011). The tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid plays anti-inflammatory and neuroprotective roles during inflammation: role of hemoxygenase-1. *Am J Pathol* 179:1360–72.

- ✚ **Kwan P and Brodie MJ** (2000). Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med* 342:314–9.

- ✚ **Lester R and Jahr C** (1992). NMDA channel behavior depends on agonist affinity. *J Neurosci* 12: 635-643.

- ✚ **Lovelace MD**, Varney B, Sundaram G, Lennon MJ, Lim CK, Jacobs K, Guillemin GJ and Brew BJ (2016). Recent evidence for an expanded role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in neurological diseases. *Neuropharmacol* 1-16.

- ✚ **Lynch BA**, Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh SM, Matagne A and Fuks B (2004). The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proc Natl Acad Sci* 101: 9861–9866.

- ✚ **Lynch DR and Guttman RP** (2001). NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. *Curr Drug Targets* 2:215-31.

- ✚ **Madeo M**, Kovács AD and Pearce DA (2004). The Human Synaptic Vesicle Protein, SV2A, Functions as a Galactose Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 289, No. 48, pp. 33066–33071

- ✚ **Marini H**, Costa C, Passaniti M, Eposito M, Campo GM, Ientile R, Adamo EA, Marini R, Calabresi P, Altavilla D, Minutoli L, Pisani F and Squadrito F (2004). Levetiracetam protects against kainic acid-induced toxicity. *Life Sc* 74: 1253-1264.

- ✚ **Mercadé Cerdá JMa**, Sancho Rieger J, Mauri Llerda JA, López Gózales FJ y Salas Puig X (2012). Guías diagnósticas y terapéuticas de la Sociedad Española de Neurología.

- ✚ **Millá A** (2003). Mecanismos moduladores de la liberación de glutamato en corteza cerebral: imagen de calcio de terminales sinápticos. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.

- ✚ **Miyazaki I**, Murakami S, Torigoe N, Kitamura Y and Asanuma M (2015). Neuroprotective effects of levetiracetam target xCT in astrocytes in parkinsonian model mice. Accepted review article.

- ✚ **Moroni F**, Lombardi G, Moneti G and Aldino C (1984). The excitotoxin quinolinic acid is present in the brain of several mammals and its cortical content increases during the aging process. *Neurosci Lett* 47: 51-55.

- ✚ **Moroni F**, Russi P, Carla V and Lombardi G (1988). Kynurenic acid is present in the rat brain and its content increases during development and aging processes. *Neurosci Lett* 94: 1-2, 145–150.

- ✚ **Naylor S and Schonfeld JM** (2014). Therapeutic Drug Repurposing: repositioning and rescue. *Drug Discovery World*. Disponible en línea y consultado el 17 noviembre 2016: <http://www.ddw-online.com/drug-discovery/p274232-therapeutic-drug-repurposing:-repositioning-and-rescue.html>

- ✚ **Olney JW** (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164: 719-721.

- ✚ **Parrott JM and O'Connor JC** (2015). Kynurenine 3-monooxygenase: an influential mediator of neuropathology. *Frontiers in Psychiatry* 10.3389/fpsy.2015.00116.

- ✚ **Patsalos PN** (2004). Clinical pharmacokinetics of levetiracetam. Clin. Pharmacokinet 43: 707—724.

- ✚ **Paxinos G and Watson C** (1998). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates., Academic Press, New York.

- ✚ **Pereno GL** (2010). Fisiopatología de la epilepsia del lóbulo temporal: revisión del proceso de muerte neuronal a la neuroplasticidad. Rev Argentina Cienc Comportamiento 21:46-57.

- ✚ **Pérez-De La Cruz V**, Carrillo-Mora P and Santamaría A (2012). Quinolinic Acid, an endogenous Molecule combining excitotoxicity, Oxidative stress and Other Toxic Mechanisms. Inter J of Tryptophan Res 5: 1–8.

- ✚ **Pérez-Severiano F**, Rodríguez-Pérez M, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Ortiz-Plata A, Sánchez García A, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Aguilera P and Santamaría A (2004). S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorate acid-induced neurotoxicity and oxidative damage Neurochemistry International 45 1175–1183

- ✚ **Platenik J**, Stopka P and Vejrazka M (2001). Quinolinic acid–iron (II) complexes: slow autooxidation, but enhanced hydroxyl radical production in the Fenton reaction. Free Radic Res. 34:445–59.

- ✚ **Purves D**, Augustin GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia AS, Mcnamara JO y Williams SM (2008). Neurociencia, capítulo 17: Modulación del movimiento

por los ganglios basales, pp. 459-475, 3a Edición, Editorial Médica Panamericana.

- ✚ **Ramírez-Jarquín UN**, Lazo-Gómez R, Tovar-Y-Romo LB and Tapia R (2014). Spinal inhibitory circuits and their role in motor neuron degeneration. *Neuropharmacology* 82:101-7.

- ✚ **Rogawski MA** (2016). A New SV2A Ligand for Epilepsy. *J Cell* 167 3:587.

- ✚ **Sarmiento LA** (2014). Determinación de Levetiracetam en suero mediante HPLC-UV. *Revista Med* 22 1: 12-19.

- ✚ **Scattoni ML**, Valanzano A, Pezzola A, De March Z, Fusco FR, Popoli P and Calamandrei G. Adenosine A2A receptor blockade before striatal excitotoxic lesions prevents long term behavioural disturbances in the quinolinic rat model of Huntington's disease. *Beh Brain Res* 176: 216–221

- ✚

- ✚ **Sayin U**, Osting S, Hagen J, Rutecki P, Sutula T (2003). Spontaneous seizures and loss of axo-axonic and axo-somatic inhibition induced by repeated brief seizures in kindled rats. *J Neurosci* 23: 2759-68.

- ✚ **Schwarcz R and Kohler C** (1983). Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid. *Neurosci Lett* 38: 85–90.

- ✚ **Schwarcz R**, Foster AC, French ED, Whetsel J and Kohler C (1984). Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sciences* 35: 19-32.

- ✚ **Siniscalchi A**, Gallelli L, Russo E and De Sarro G (2013). A review on antiepileptic drugs-dependent fatigue: Pathophysiological mechanisms and incidence. *Europ J of Pharmacol* 718: 10–16.

- ✚ **Stone TW** (2001). Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *P Neurobiol.* 64: 185–218.

- ✚ **Targas Yacubian EM, Contreras-Caicedo G y Ríos-Pohl L** (2014). Tratamiento farmacológico de las epilepsias. Editorial Alade. Abbott. Disponible en línea, consultado el 14 de abril de 2017: <http://www.ilae.org/booksales/documents/TratamientoFarmacologico-ALADE.pdf>

- ✚ **Trotti D, Danbolt NC and Volterra A** (1998). Glutamate transporters are oxidantvulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration. *Trends Pharmacol Sci* 19:328–34.

- ✚ **Ueda Y**, Doi T, Takaki M, Nagatomo K, Nakajima A and Willmore LJ (2009). Levetiracetam enhances endogenous antioxidant in the hippocampus of rats: In vivo evaluation by brain microdialysis combined with ESR spectroscopy. *Brain Res* 1266: 1–7.

- ✚ **Ussher JR, Jaswal JS and Lopaschuk GD** (2012). Pyridine nucleotide regulation of cardiac intermediary metabolism. *Circ Res* 111 5: 628-641.

- ✚ **Vamos E**, Pardutz A, Klivenyi P, Toldi J and Vecsei L (2009). The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: Possibilities for neuroprotection. *J Neurol Sciens* 283: 21 –27.

- ✚ **Varju P**, Katarova Z, Madarasz E, Szabo G (2001). GABA signalling during development: new data and old questions. *Cell Tissue Res* 305: 239-46.

- ✚ **Velandia ML**, Garavito ZV, Caldas ML y Hurtado H (2001). ATPasa de calcio en el sistema nervioso. *Biomédica* 21: 62-9.

- ✚ **Weijie G**, Yingjun Z, Zhenfeng Z, Ning T, Fangyu Z, Chao G, Linhui L, Deshui J, Taoyang Ch, Ming Y, Jinjun L and Xianghuo H (2011). Disruption of xCT inhibits cell growth via the ROS/autophagy pathway in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* 312: 55–61.

- ✚ **Wheeler RA and Carelli RM** (2008). Dissecting motivational circuitry to understand substance abuse. *Neuropharmacol.* 56 Suppl 1:149-59.

- ✚ **Wright Ch**, Downing J, Mungall D, Khan O, Williams A, Fonkem E, Garrett D, Aceves J and Kirmani B (2013). Clinical pharmacology and pharmacokinetics of levetiracetam: 10.3389/fneur.2013.00192

- ✚ **Zesiewicz TA**, Sanchez-Ramos J, Sullivan KL and Hauser RA (2005). Levetiracetam-Induced Parkinsonism in a Huntington Disease Patient. *Clin Neuropharmacol* 28:188–190.

- ✚ **Zesiewicz TA**, Sanchez-Ramos J, Sullivan KL and Hauser RA (2005). Levetiracetam-Induced Parkinsonism in a Huntington Disease Patient. *Clin Neuropharmacol* 28:188–190

✚ **Zito K and Scheuss V** (2009). NMDA Receptor Function and Physiological Modulation. Elsevier Encyclopedia of Neuroscience, pp.1157-1164.