

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

COORDINACIÓN DE PSICOFISIOLOGÍA

**Participación de los mGluR I, en los mecanismos de epilepsia y  
neurodegeneración en el hipocampo, *in vivo***

TESIS:

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A:

Maria Teresa Rivera García

Director: Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia

Revisor: Dra. María A. Corsi Cabrera

MEXICO, D. F.

Junio de 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*“Ciencia es el intento de hacer que la caótica diversidad de nuestra experiencia sensorial corresponda a un sistema lógico y uniforme de pensamiento ... la experiencia sensorial es la materia de estudio pero la teoría que debe interpretarla es hecha por el hombre, es... hipotética, nunca completamente terminada, siempre sujeta a cuestionamientos y dudas”*

*Albert Einstein*

**DEDICATORIA**

*A MI MADRE*

*A MI ABUELA*

*A JOSÉ I. GARCÍA SANDOVAL (in memoriam)*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mi mamá por su incansable lucha en la vida, por su arduo trabajo, por su cariño y apoyo en todo momento.*

*Al Dr. Ricardo Tapia por abrirme las puertas de su laboratorio, por sus comentarios y revisión constante, pero sobre todo por compartir su experiencia y mostrarme lo formidable de su vocación.*

*A mi abuela por sus inagotables cuidados, por sus invaluable enseñanzas, por su paciencia y afecto desde siempre.*

*A mi abuelo quien dejó una huella imborrable con su gran ejemplo.*

*A mis hermanas por todo lo que me han enseñado, por su valentía, por compartirme sus experiencias, y porque con su fortaleza he aprendido a admirarlas y quererlas cada día un poco más.*

*A mi tía Reyna por tener siempre las palabras precisas en el momento adecuado, por sus consejos, por su escucha, por su estoicidad y por todo su cariño.*

*A mi tía Magda por la ayuda brindada, y por los momentos de cercanía y preocupación.*

*A Victor por acompañarme en este proceso, por su cariño y tolerancia, por los maravillosos momentos que han formado nuestra vida en pareja, por lo apacible e intenso de nuestra relación, y por las ganas compartidas de seguir caminando juntos.*

*A mi papa por el apoyo económico, por sus recomendaciones y por haber sentado las bases para mi formación personal y profesional.*

*A nuestra Alma Mater, la UNAM, por las oportunidades y logros a los que he podido acceder dentro de ella.*

*A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) por brindarme el apoyo económico para la realización de este trabajo.*

*A mis amigos (en orden cronológico de trato): Daniela y Christian; Marco, Bianca, Betty, Laura, Bere, Sonia, Silvia y Tonatuh; Irene, Martha y el España; Mar, Lidia y Chuy. Por compartir gran parte de la carrera, por lo que les he aprendido y por lo que vivimos dentro, pero sobre todo fuera de las aulas.*

*A Hilda Moncada por su preocupación, por su afecto, por su apoyo, por todos sus consejos, por ser mi amiga y darme fuerza en momentos duros.*

*A mi amigo Rodrigo, quién se ha adelantado en el camino, por todos los alivianes con la compu, por haberme brindado su amistad y por la enseñanza que dejó con su partida.*

*A mi maestra y amiga Gabriela Vera por todo su tiempo, por su paciencia, por su perseverancia para hacer de mi camino en el laboratorio un trabajo menos duro, por creer en mí y por estar en cada una de las páginas de este trabajo.*

*A mis amigas Nallely Pacheco y Cristina Juarez por hacer de mi estancia en Guadalajara una de las mejores etapas de mi vida.*

*A mis compañeros de laboratorio, por sus comentarios, su apoyo y objetividad.*

*A la Dra. Alejandra Ruiz, a la Mtra. Ana Eugenia Díaz de León, a la Dra. Mari Corsi y la Dra. Martha Lilia Escobar, porque con sus comentarios hicieron de éste un trabajo más sólido.*

*A los que por alguna razón olvidé, pero que sin duda han sido parte esencial en mi vida*

## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	1
<b>Lista de abreviaciones</b>	2
<b>1. Introducción</b>	3
1.1. Transmisión sináptica	3
1.2. Transmisión glutamatérgica	6
1.3. Receptores a glutamato	8
1.4. Transportadores de glutamato	10
1.5. Excitotoxicidad	11
1.6. Epilepsia	14
<b>2. Antecedentes</b>	18
2.1. La 4-AP	18
2.2. El PDC	19
2.3. Receptores metabotrópicos a glutamato del grupo I	21
<b>3. Justificación y Pregunta de Investigación</b>	22
<b>4. Hipótesis</b>	24
<b>5. Materiales y Metodología</b>	24
5.1. Microdiálisis	24
5.2. Sujetos	25
5.3. Diseño Experimental	25
5.4. Cirugía y administración de las drogas	26
5.5. Registro EEG	30
5.6. Observación conductual	31
5.7. Análisis histológico	32
5.8. Análisis estadístico	33

<b>6. Resultados</b>	34
6.1. Controles Krebs Ringer	34
6.2. Administración de 4-AP	35
6.3. Activación de los mGluRI con el agonista DHPG	41
6.4. Bloqueo de los mGluRI con el antagonista AIDA	49
<b>7. Discusión</b>	60
<b>8. Conclusiones</b>	72
<b>9. Referencias bibliográficas</b>	74
<b>ANEXO 1</b>	83



## Resumen

La epilepsia es un síndrome crónico que se caracteriza por la descarga excesiva de grupos de neuronas que puede propagarse a prácticamente todo el cerebro y manifestarse clínicamente en las llamadas crisis convulsivas. La hipótesis más aceptada sobre el mecanismo que subyace a la epilepsia es el desequilibrio químico entre la transmisión sináptica excitadora e inhibitoria, mediadas por el ácido glutámico y el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) respectivamente. El equilibrio puede romperse ya sea por el incremento de la transmisión excitadora, el decremento de la inhibitoria o la combinación de ambas.

Un modelo experimental para el estudio de esta condición patológica es la administración de 4-aminopiridina (4-AP) en el hipocampo de ratas *in vivo*; esta droga bloquea canales de  $K^+$ , incrementa el tiempo de la fase despolarizante, promueve la liberación de neurotransmisores, aumentando con ello la transmisión excitadora, provocando crisis epileptiformes y neurodegeneración.

El glutamato es capaz de activar diversos receptores tanto de tipo ionotrópico como metabotrópico. Sobre estos últimos se ha puesto particular atención, ya que algunos subtipos se localizan en la presinápsis y actúan como autoreceptores al inhibir la liberación de glutamato, por lo que protegen de la muerte celular y la epilepsia. Mientras que otros subtipos, además de estar localizados en la postsinápsis, desencadenan cascadas bioquímicas que favorecen la muerte celular. Tal es el caso de los receptores metabotrópicos a glutamato del grupo I (mGluR I).

En el presente trabajo, empleando la técnica de microdiálisis en libre movimiento en combinación con técnicas electroencefalográficas (EEG) e histológicas, y observando cuidadosamente la conducta de los animales durante los experimentos, se estudió la participación de los mGluR I dentro del proceso excitotóxico que desencadena la 4-AP, en el hipocampo de ratas despiertas. Para ello se utilizó el agonista 3,5-dihidroxifenilglicina (DHPG) y el antagonista RS-1-aminoindán-1,5-ácido dicarboxílico (AIDA).

Nuestros resultados indican que, la administración del agonista selectivo DHPG exacerbó la actividad epileptiforme sin que exista relación con la neurodegeneración observada.

Por el contrario, el bloqueo de los mGluR I con el antagonista AIDA mostró tendencia a reducir la concentración extracelular de glutamato y redujo la neurodegeneración en la región CA1 del hipocampo, pero no disminuyó las crisis epileptiformes en el EEG.





## Lista de Abreviaciones

<b>4-AP</b>	4-aminopiridina
<b>AAE</b>	aminoácidos excitadores
<b>AIDA</b>	RS-1-aminoindan-1,5-acido dicarboxílico
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxasol-4-propionato
<b>AMPc</b>	adenosín monofosfato cíclico
<b>CCSV</b>	canales de Ca <sup>2+</sup> sensibles a voltaje
<b>CPP</b>	(+) 3-(2-carboxipiperazin-4il)-propil-1-fosfonato
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>DHPG</b>	3,5-dihidroxifenilglicina
<b>DP</b>	descarga paroxística
<b>EEG</b>	registro electroencefalográfico
<b>GABA</b>	ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>HPLC</b>	cromatografía líquida de alta resolución
<b>IP<sub>3</sub></b>	inositol-1,4,5-trifosfato
<b>i. p.</b>	intraperitoneal
<b>L-AP4</b>	L-2-amino-4-fonobutirato
<b>MAP4</b>	(S)-2-amino-2-metil-4-ácido fosfonobutanoico
<b>mGluRs</b>	receptores metabotrópicos a glutamato
<b>MK-801</b>	maleato de dozociplina
<b>MSOP</b>	(R,S)- $\alpha$ -metil-serina-o-fosfato
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NBQX</b>	2,3-dihydro-6-nitro-7-sulfamoil-benzo(f)quinovalina
<b>OPA</b>	o-oftaldialdehído
<b>PDC</b>	ácido L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxílico
<b>PKC</b>	proteína cinasa C
<b>PLC</b>	fosfolipasa C
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central



## **1. Introducción**

A través del tiempo los psicólogos han estudiado el curso de los procesos mentales: de la percepción y la memoria, del lenguaje y el pensamiento, de la organización del movimiento y de la acción. El cerebro humano es capaz de reflejar las complejidades e intrincaciones del mundo que nos rodea. Los procesos nerviosos nos capacitan para analizar y almacenar información del mundo exterior, es mediante la construcción de sistemas complejos que programamos, regulamos y verificamos nuestra actividad mental, dirigida a la consecución de metas, cumplimientos de designios y realización de planes (Luria, 1974).

Los procesos psicológicos que de manera global entendemos como nuestra vida mental son producto de la actividad del sistema nervioso. Éste a su vez está compuesto por millones de células que trabajan y se comunican de manera coordinada para el procesamiento de información (Kandel, 1999).

### **1.1. Transmisión Sináptica**

Para llevar a cabo dicha comunicación, todas las neuronas utilizan una de las dos formas de transmisión que existen, ya sea eléctrica o química, denominando sinapsis a la zona especializada en la que una neurona se comunica con otra. La mayoría de las sinapsis en el sistema nervioso son de carácter químico mediadas por moléculas mensajeras llamadas neurotransmisores (Davenport, 1991; Holz y Fisher, 2006).



El neurotransmisor comunica a la neurona presináptica con la célula postsináptica teniendo de por medio la hendidura sináptica. La transmisión química se puede resumir en cinco etapas: 1) síntesis del neurotransmisor en la célula presináptica, 2) empaquetamiento del neurotransmisor dentro de vesículas secretoras, 3) liberación de los neurotransmisores al espacio sináptico, 4) activación de receptores específicos en la membrana postsináptica y, 5) recaptación y reutilización de los neurotransmisores (Holz y Fisher, 2006).

Brevemente, la comunicación interneuronal inicia cuando ante estímulos de cierta magnitud se genera un potencial de acción capaz de propagarse por todo el axón hasta la terminal sináptica. El potencial de acción genera un cambio en el potencial de membrana ocasionando la apertura de canales de calcio sensibles a voltaje (CCSV). Por efecto de la entrada y el aumento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  las vesículas sinápticas se fusionan a la membrana plasmática y las moléculas del neurotransmisor son liberadas por exocitosis. Una vez liberados los neurotransmisores difunden por la hendidura sináptica hasta unirse a receptores específicos localizados en la neurona postsináptica (Pasantés et al., 1991).

Existen dos tipos de receptores, los ionotrópicos que permiten la entrada de iones y con ello un cambio rápido en la excitabilidad neuronal, y los llamados metabotrópicos que están asociados a una



proteína G. Los cuales al ser activados desencadenan reacciones metabólicas y enzimáticas intracelulares. Los productos de estas reacciones son moléculas conocidas como segundos mensajeros, tal es el caso del inositol trifosfato ( $IP_3$ ), el diacilglicerol (DAG) y el adenosín monofosfato cíclico (AMPC).

Los segundos mensajeros participan en vías de señalización que producen reacciones sinápticas lentas y modulan la excitabilidad neuronal (Pasantés et al., 1991).

Finalmente, para terminar la función de los neurotransmisores estos deben ser eliminados del espacio sináptico, tarea que se lleva a cabo mediante tres mecanismos principales, ya sea por difusión, por degradación enzimática o por recaptura (Kandel, 2001). La recaptura es el mecanismo más importante ya que, además de terminar la acción sináptica, permite la recuperación de las moléculas del neurotransmisor para ser posteriormente reutilizadas. La recaptura depende de proteínas específicas llamadas transportadores, los cuales se localizan tanto en células gliales como en neuronas (Kandel, 2001).

Los neurotransmisores se pueden clasificar de acuerdo a su función o a su estructura y composición bioquímica. Por su función se dividen en excitadores e inhibidores, según su probabilidad de producir potenciales postsinápticos excitatorios (PPE's) o inhibitorios (PPI's) y con ello aumentar o disminuir la frecuencia de disparo de la neurona



postsináptica (Peña, 2001). Conforme a su estructura y composición química encontramos a los aminoácidos, las aminas biogénicas, los neuropéptidos y la acetilcolina (Kandel, 2001).

El glutamato se ubica dentro del grupo de los aminoácidos y actualmente es reconocido como el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso de mamíferos (Kandel, 2001). Se distribuye prácticamente en todas las regiones del mismo y, por ello, está relacionado con un gran número de funciones (Greenamyre, 1986).

Inducir el incremento en la liberación de neurotransmisores excitadores, específicamente de glutamato, es empleado en este trabajo como herramienta experimental para el estudio de los mecanismos que subyacen a la epilepsia, de lo cual se hablará en los siguientes apartados.

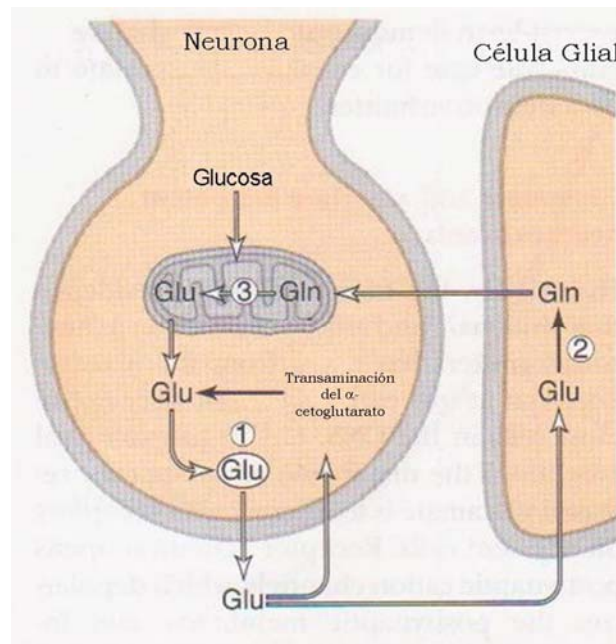
## **1.2. Transmisión Glutamatérgica**

El glutamato es un aminoácido no esencial que no cruza la barrera hematoencefálica por lo que es sintetizado en el sistema nervioso central (SNC) (Dingledine y McBain, 1994). Las enzimas del metabolismo del glutamato se localizan tanto en neuronas como en células gliales (Hazle y Dingledine, 2006). Como se esquematiza en la Figura 1, la síntesis del glutamato implica la conversión de glutamina a glutamato por acción enzimática de la glutaminasa, o bien, por la transaminación del  $\alpha$ -cetoglutarato y otros aminoácidos como la



alanina y el ácido aspártico dentro del ciclo de ácidos tricarboxílicos (Hazle y Dingleline, 2006).

El glutamato sintetizado se almacena en vesículas sinápticas mediante un transporte activo mediado por una ATPasa dependiente de  $Mg^{2+}$  a favor del gradiente electroquímico de protones (Broman et al., 2000). Se estima que la concentración de glutamato en cada vesícula sináptica es de 100 mM (Broman et al., 2000), estas vesículas se fusionan en la membrana plasmática y se libera el glutamato en respuesta a la despolarización y el consecuente flujo de  $Ca^{2+}$  (Broman et al., 2000).



**Figura 1.** Metabolismo de glutamato (Glu) en estructuras sinápticas. Paso 1. El glutamato sintetizado es almacenado en vesículas sinápticas. Paso 2. Al ser liberado el glutamato al espacio sináptico y capturado por las células gliales, es convertido a glutamina (Gln), por acción de la glutamino sintasa. Paso 3. La glutamina luego es regresada a la terminal nerviosa y por acción enzimática de la glutaminasa se hace la conversión de glutamina a glutamato dentro del compartimiento mitocondrial y el glutamato es nuevamente almacenado. La transaminación del  $\alpha$ -cetoglutarato es otra vía de síntesis de glutamato. (Dingleline y Mc Bain, 1999).



### 1.3. Receptores a Glutamato

Los receptores a glutamato median la neurotransmisión excitadora en el cerebro y desempeñan un papel fundamental en procesos cognitivos de aprendizaje y memoria, además son determinantes en el curso de trastornos neurodegenerativos (Nakanishi, 1992).

Una clasificación general divide a los receptores a glutamato en dos grupos: los ionotrópicos, que permiten el paso relativamente selectivo de iones y los metabotrópicos, que están acoplados a proteínas G y actúan activando segundos mensajeros. Estos dos tipos de receptores difieren en su estructura, función, propiedades electrofisiológicas y farmacológicas (Nakanishi, 1992).

Los receptores ionotrópicos se han clasificado de acuerdo a su afinidad por diferentes compuestos subdividiéndose en dos familias, los que reconocen al N-metil-D-aspartato (NMDA) y los que reconocen al  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxasol-4-propionato (AMPA) y al kainato, también llamados tipo no-NMDA (Kew y Kemp, 2005).

Los receptores tipo NMDA y no-NMDA son canales iónicos embebidos en la membrana plasmática, por lo que al activarse permiten el paso de corrientes catiónicas de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , en el caso de los tipo no-NMDA. Mientras que el receptor NMDA además permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Kew y Kemp, 2005; Michaelis, 1997).

Una diferencia fundamental entre los receptores ionotrópicos es su sensibilidad al voltaje, ya que a diferencia de los tipo no-NMDA, los



receptores NMDA tienen al interior un sitio de unión a  $Mg^{2+}$  que bloquea el canal y únicamente puede desplazarse por un cambio despolarizante en la membrana (Hazle y Dingledine, 2006; Kew y Kemp, 2005).

Por su parte, los receptores metabotrópicos localizados tanto en la membrana presináptica como en la postsináptica son secuencias de aminoácidos de siete segmentos hidrofóbicos transmembranales (Pin y Duvoisin, 1995) que no forman canales iónicos sino que están acoplados a diferentes mecanismos de transducción de señales intracelulares a través de la activación de proteínas G (Shigemoto y Mizuno, 2000). El carboxilo terminal de la secuencia peptídica de estos receptores se localiza intracelularmente, es de longitud variable y no se conserva similar entre los subtipos de los grupos (Pin y Duvoisin, 1995), mientras que el amino terminal localizado en el medio extracelular se ha postulado como el dominio de unión al ligando (Pin y Duvoisin, 1995).

Los receptores metabotrópicos a glutamato (mGluRs) incluyen 8 subtipos que se han clasificado en tres grupos (I, II y III) basándose en la identidad de su secuencia de aminoácidos, en sus propiedades farmacológicas y en la cascada intracelular que desencadenan. Los subtipos mGluR1 y mGluR5 pertenecen al grupo I acoplado a la fosfolipasa C (PLC) que al ser estimulada promueve la generación de inositol-1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ), diacilglicerol (DAG) y activación de la





proteína cinasa C (PKC) (Shigemoto y Mizuno, 2000; Pin y Duvoisin, 1995). Las investigaciones de inmunoreactividad señalan que este grupo se localiza en la postsinápsis (Cartmell y Schoepp, 2000), pero fuera de la zona activa o región perisináptica (Shigemoto et al., 1997; Shigemoto y Mizuno, 2000).

Los grupos II y III están acoplados a la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) y con ello la inhibición en la formación de AMPc (Shigemoto y Mizuno, 2000; Pin y Duvoisin, 1995). Los receptores del grupo II se localizan en sitios pre y postsinápticos, alejados de las zonas activas. Mientras que los del grupo III se encuentran en la zona activa de las terminales presinápticas (Shigemoto et al., 1997).

#### **1.4. Transportadores de Glutamato**

Una vez que el glutamato actúa sobre la célula postsináptica su acción debe ser terminada rápidamente, lo cual ocurre gracias a su remoción del espacio extracelular, tarea que depende principalmente de un sistema de recaptura efectuado por una familia de proteínas específicas llamadas transportadores, localizados en las membranas plasmáticas tanto de astrocitos como de neuronas (Danbolt, 2000). Estos transportadores de alta afinidad utilizan gradientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de la membrana plasmática para llevar a cabo el transporte (Shigeri et al., 2004).

Se han caracterizado, en el SNC, 5 tipos de estos transportadores de glutamato, que además de expresarse en diferentes tipos celulares, se



localizan en diferentes regiones. El GLT1 (EAAT2) y el GLAST (EAAT1) son expresados en astrocitos. El primero está distribuido en todo el cerebro con elevadas concentraciones en hipocampo y corteza cerebral; el segundo está presente en células de Bergmann del cerebelo (Shigeri et al., 2004; Danbolt, 2000). Por el contrario, los EAAC1 (EAAT3), EAAT4 y EAAT5 se expresan en neuronas. El EAAT3 se encuentra principalmente en corteza, cerebelo e hipocampo. Mientras que los EAAT4 y EAAT5 se localizan en células de Purkinje y fotorreceptores, respectivamente (Shigeri et al., 2004).

Los transportadores de glutamato son responsables de mantener baja la concentración extracelular de este aminoácido, lo que en buena medida protege a las neuronas del daño excitotóxico (Yi y Hazell, 2006). Por tanto, al haber una deficiencia en estos transportadores, o bien, un exceso en la liberación de glutamato desde las terminales nerviosas se puede dar origen a un fenómeno conocido como excitotoxicidad (Olney, 2003).

### **1.5. Excitotoxicidad**

Estudios de la década de los 70-80's demostraron que el glutamato bajo determinadas circunstancias ejercía una acción de endotoxina (Choi, 1988; Olney, 1978). En estos trabajos se asoció la despolarización excesiva con el aumento anormal de la transmisión glutamatérgica, lo que generaba la sobreactivación de los receptores a glutamato y el

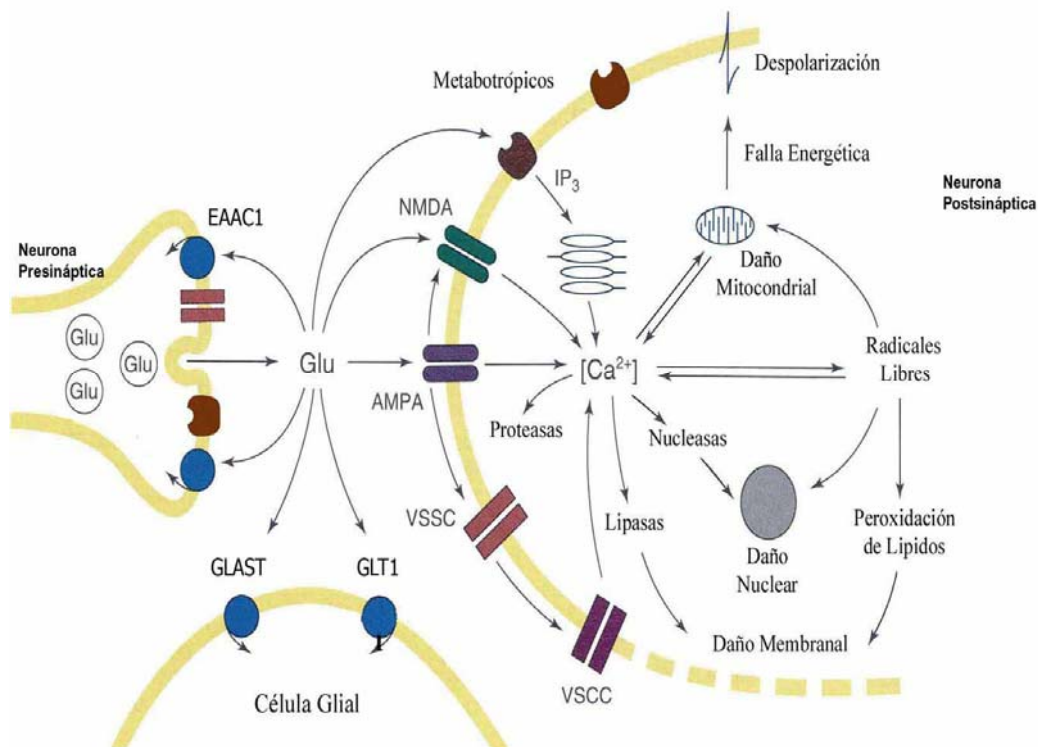


consecuente daño celular (Olney, 1978). Aunque, actualmente se sabe que la acción excitadora del glutamato está mediada por la activación tanto de los receptores ionotrópicos como de los metabotrópicos (Michaelis, 1997; Ozawa, 1998), es especialmente la sobreactivación de los receptores NMDA la que desencadena una serie de reacciones metabólicas. Una primer etapa se caracteriza por el hinchamiento del soma y las dendritas debido a la movilización intracelular de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , los cuales generan un cambio en la presión osmótica y con ello la entrada de agua (Rothman, 1985). Más tarde, el daño neuronal está determinado por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y los efectos tóxicos que este catión genera (Petrovic et al, 2005). El  $\text{Ca}^{2+}$  tiene una importante participación en la muerte excitotóxica, ya que su incremento citosólico activa diversas enzimas como proteasas que degradan proteínas estructurales y con ello el sistema de microtúbulos (Arias, 1991), fosfolipasas que contribuyen al rompimiento de la membrana celular, la liberación de ácido araquidónico y la producción de radicales libres (Tapia et al., 1999). Además de endonucleasas responsables de la degradación de ácidos nucleicos que inducen el daño del núcleo celular, todas ellas de manera conjunta llevarán a la célula a su muerte (Tapia, 1998; Tapia et al., 1999).

En la Figura 2 se muestra el esquema de las reacciones bioquímicas que desencadena la sobreactivación del receptor NMDA y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ .



En resumen, el término excitotoxicidad se refiere al proceso de muerte neuronal producto de la capacidad de los aminoácidos excitadores para sobreactivar y dañar células nerviosas.



**Figura 2.** Esquema de una sinapsis glutamatergica y las cascadas bioquímicas que participan en el mecanismo de excitotoxicidad. Se muestra que el neurotransmisor es producto de la síntesis específica de cada neurona y es liberado al medio extracelular activando los diferentes receptores. Así como las cascadas bioquímicas que participan en la excitotoxicidad, descrito en el texto. Receptores: AMPA, NMDA y metabotrópicos. Transportadores: EAAC1, GLAST y GLT1. CCSV: canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje.

El aumento en la transmisión sináptica glutamatergica se ha relacionado con diferentes enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la neurodegeneración que se observa en la epilepsia (Arias, 1991).



## **1.6. Epilepsia**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la epilepsia se define como “una afección crónica de etiologías diversas caracterizada por la repetición de crisis resultantes de la descarga excesiva de neuronas cerebrales, independientemente de los síntomas clínicos o paraclínicos eventualmente asociados” (Brailowsky, 1999). Se estima que el 5% de la humanidad ha tenido al menos una crisis en su vida y por lo menos 40 millones de personas en el mundo son epilépticos (Rubio, 1997).

Según los datos neurobiológicos, la epilepsia es un síndrome crónico que consiste en una alteración en el balance neuroquímico entre la transmisión excitadora mediada por el ácido glutámico y la inhibidora mediada por el ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) (Rubio, 1997; Tapia y Massieu, 1997). En la epilepsia participan todas las células que componen el sistema nervioso aunque hasta ahora la investigación se ha centrado en la hiperexcitabilidad neuronal, ya que un aumento en la actividad de las células nerviosas es lo que genera las llamadas crisis epilépticas. (Rubio, 1997).

Las crisis epilépticas se caracterizan por sus síntomas clínicos y por su traducción electroencefalográfica (EEG). Ambos criterios permiten distinguir dos formas principales de crisis epilépticas: las parciales o focales y las generalizadas (Brailowsky, 1999; Rubio, 1997).



Las crisis parciales implican inicialmente una porción limitada de neuronas corticales en un solo hemisferio cerebral y su manifestación dependerá del área implicada (Rubio, 1997). Las crisis generalizadas implican desde su inicio y de manera difusa una gran porción de neuronas corticales y subcorticales en ambos hemisferios cerebrales pudiendo tener presente un foco epiléptico (Rubio, 1997).

En el foco epiléptico las neuronas presentan de manera sincronizada la respuesta conocida como descarga paroxística (DP) caracterizándose por una despolarización súbita, de 20 a 40 mV con duración de entre 50 y 200 milisegundos., que posteriormente genera un tren de potenciales de acción (Peña, 2001), hasta el establecimiento del *status epilepticus*, el cual se define como la condición en la que crisis epilépticas severas, repetitivas, constantes y prolongadas establecen marcadas lesiones en diferentes regiones cerebrales (Feria et al., 1997).

Aunque en la actualidad se sabe que la epilepsia no es una enfermedad sobrenatural ni divina, su incidencia no ha dejado de ser estigmatizada. Aparece ante la sociedad como un padecimiento biológico de características devastadoras convirtiéndose en la causa de múltiples limitaciones de quienes la sufren, produciéndoles un desajuste social que a través de la historia los ha llevado a ser apartados y temidos (Hernández, 2004). Los problemas psicológicos y sociales involucran tanto a quienes la padecen como a las personas íntimamente relacionadas con ellos (Lechtenberg, 1989), de tal forma que se afecta el

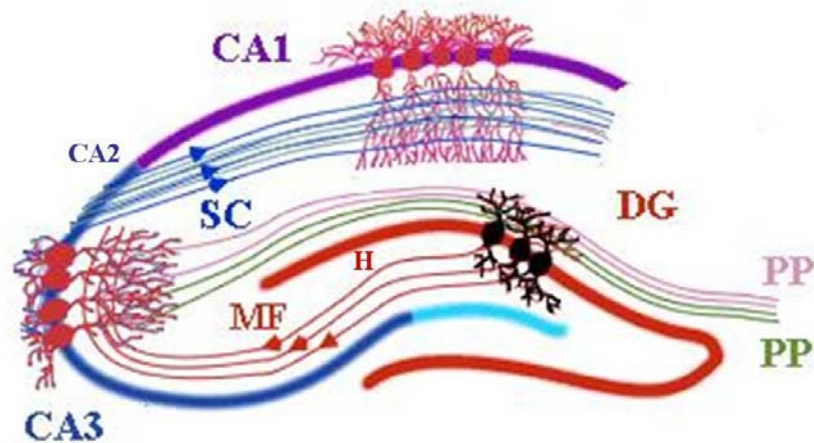


individuo desde la infancia hasta la edad adulta, en la escuela, en la práctica de deportes y otras actividades lúdicas, en su trabajo, en su sexualidad y demás aspectos de su relación de pareja (Hernández, 2004). Su impacto social depende en buena medida del tipo y frecuencia de las crisis aunque mucha de su fuerza destructora procede de su impredecibilidad (Lechtenberg, 1989).

Las observaciones de los cambios neuromorfológicos en cuadros convulsivos indican que el hipocampo es una región muy susceptible de afectarse en esta patología (Feria y Castillo, 1997).

El hipocampo es una estructura subcortical que forma parte del sistema límbico (Kandel, 2001). Las células piramidales que conforman el hipocampo se alinean en una C, es por su peculiar forma que esta región ha sido denominada cuerno de Amón, en ella se han distinguido tres subregiones: CA1, CA2 y CA3, además del giro dentado y el hilus. En la figura 3 se muestran las subregiones, así como, las vías que conforman el circuito trisináptico en el hipocampo.

El hipocampo posee tres vías principales; la vía perforante, que proyecta desde la corteza entorrinal a las células granulosas de la circunvolución dentada; la vía de las fibras musgosas, que contiene los axones de las células granulosas y que llega a las células piramidales de la región CA3; y la vía colateral de Schaffer, que consiste en colaterales excitadoras de las células piramidales de CA3 que terminan en las piramidales de CA1 (Kandel, 2001).



**Figura 3.** Esquema del hipocampo. Se muestran las áreas en las que se ha dividido: CA1, CA2 y CA3, el giro dentado (DG) y el hilus (H). Así como las vías que conforman este circuito trisináptico: la vía perforante (PP), que a su vez se divide en lateral y media; la vía de las fibras musgosas (MF) y la vía de las colaterales de Schaffer (SC).

En algunos tipos de epilepsia se ha encontrado nivel elevado de aminoácidos excitadores en el líquido cefalorraquídeo y en el foco epiléptico de pacientes que presentan este síndrome (Carlson, 1992). Por su parte, los datos experimentales han descrito aumento en la concentración extracelular de glutamato por daño isquémico (Zeng et al., 2007) y por generación de crisis epileptiformes (Tapia y Massieu, 1997). Además, los agonistas glutamatérgicos han mostrado ser poderosos convulsivantes (Kato et al., 2008; Toscazo et al., 2008).

Experimentalmente se ha empleado la 4-aminopiridina (4-AP) para incrementar la liberación de glutamato, inducir crisis epileptiformes y muerte neuronal. La 4-AP es un fármaco que bloquea selectivamente canales de  $K^+$ , prolonga el tiempo de la fase despolarizante y estimula la





liberación tanto de aminoácidos excitadores como inhibidores en diferentes preparaciones *in vitro* (Buckle y Haas, 1982; Tapia y Sitges, 1982; Versteeg et al., 1995). Los trabajos realizados *in vivo*, demostraron que la administración de 4-AP en el hipocampo de ratas anestesiadas, a una concentración de 17.5 mM, durante 12.5 minutos, incrementó la concentración extracelular de glutamato, provocó crisis epileptiformes y muerte neuronal (Tapia et al, 1999; Peña y Tapia, 1999, 2000; Ayala y Tapia, 2003, 2005). En estos mismos trabajos se describió que al administrar antagonistas de los receptores ionotrópicos a glutamato, o bien, bloqueando canales de Na<sup>+</sup> sensibles a voltaje se inhiben las crisis epilépticas y se protege contra la neurodegeneración (Ayala y Tapia, 2005; Peña y Tapia, 2000). Con ello se demostró que los efectos neurotóxicos de la 4-AP están mediados por el aumento en la liberación de glutamato.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. La 4-AP**

Las investigaciones realizadas en el laboratorio con animales despiertos o en libre movimiento, demostraron que la administración intrahipocampal de 4-AP (17.5 mM), en comparación con lo observado en animales anestesiados, potenciaba su efecto neurotóxico. Por esta razón, la concentración de 4-AP empleada con animales despiertos se redujo a 7 mM (Vera, 2004).



La administración de 4-AP (7 mM) en el hipocampo de ratas en libre movimiento, no generó un incremento claro de la concentración extracelular de glutamato; sin embargo, se observó que promueve en el electroencefalograma (EEG), actividad hipersincrónica de elevada frecuencia y baja amplitud, que antecede a la aparición de trenes de espigas de alta frecuencia y voltaje, reflejándose conductualmente como crisis epileptiformes. Finalmente, estas crisis epileptiformes derivan en el establecimiento de un estado epiléptico, mismo que generó daño celular en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo (Vera, 2004). Aunque la 4-AP (7 mM) no produjo un incremento evidente de la concentración extracelular de glutamato, más tarde, se comprobó que su efecto neurotóxico está mediado por el incremento de la transmisión glutamatérgica, ya que la administración de antagonistas, tanto de receptores tipo NMDA como no NMDA, protegen contra las crisis epileptiformes y previenen el daño neuronal (Vera, *manuscrito en preparación*).

## **2.2. El PDC**

En otros trabajos se empleó como herramienta experimental, para incrementar la concentración de glutamato extracelular, la inhibición de su transporte.

Para ello, se empleó el ácido L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxílico (PDC), el cual ha sido descrito como un inhibidor no selectivo de los transportadores de glutamato (Robinson, 1991).



Al administrar el PDC (25 mM) en el hipocampo de ratas anestesiadas, se observó un incremento en la concentración de glutamato de 10 a 20 veces sobre su concentración basal, sin que durante el experimento se advierta hiperexcitabilidad en el EEG, ni muerte celular a los 7 días después de su administración (Massieu et al., 1995; Massieu et al., 1997).

La administración intrahipocampal de PDC (50 mM) en ratas despiertas, tampoco generó crisis epileptiformes ni neurodegeneración pese al incremento de glutamato extracelular alrededor de 25 veces por encima del nivel basal (Vera, 2004). Además, al coadministrar el PDC más la 4-AP, contrariamente a lo que se esperaba, el aumento de glutamato extracelular generado por la inhibición de su recaptura, paradójicamente evitó la neurodegeneración en un 50% y redujo considerablemente las crisis epileptiformes producidas por la 4-AP (Vera, 2004).

A partir de estos últimos resultados se generó la hipótesis de que el exceso de glutamato extracelular producido por la inhibición de su transporte, paradójicamente protege contra la excitotoxicidad producida por 4-AP, probablemente porque se inhibe la liberación de glutamato por activación de los mGluR tipo III, que están localizados en las terminales presinápticas (Vera, 2004).

Como se mencionó antes, los receptores metabotrópicos a glutamato incluyen 8 subtipos, agrupados de acuerdo a la homología en su secuencia de aminoácidos, a sus propiedades farmacológicas y al



mecanismo de transducción de señales (Shigemoto y Mizuno, 2000; Pin y Duvoisin, 1995).

Los grupos II (mGluR2 y mGluR3) y III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) se encuentran acoplados negativamente a la adenilato ciclasa (AC) (Moroni et al., 1997) por lo que su activación provoca la inhibición en la formación de AMPc (Shigemoto y Mizuno, 2000; Pin y Duvoisin, 1995), diferenciándose en que el grupo III puede ser selectivamente activado por L-2-amino-4-fonobutirato (L-AP4) (Moroni et al., 1997). Por su parte, el grupo I (mGluR1 y mGluR5) esta acoplado a otra vía de señalización, la cual se describe a continuación.

### **2.3. Receptores metabotrópicos a glutamato del grupo I**

Los mGluR I están acoplados a la estimulación de la PLC (Moroni et al., 1997), por lo que al ser activados promueven la hidrólisis de fosfoinosítidos (Cartmell y Schoepp, 2000). Específicamente, la PLC hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, un componente lipídico de la membrana plasmática. La hidrólisis genera dos segundos mensajeros, el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). El IP<sub>3</sub> difunde al citoplasma y desencadena la liberación de Ca<sup>2+</sup> de estructuras intracelulares como el retículo endoplásmico. Mientras que, el DAG permanece unido a la membrana ejerciendo una influencia moduladora sobre la PKC (Shigemoto y Mizuno, 2000; Pin y Duvoisin, 1995).



Se ha referido que el 3,5-dihidroxifenilglicina (DHPG) es el principal agonista de estos receptores (Schoepp et al., 1994), siendo su selectividad el criterio de elección en este trabajo. Por su parte, las carboxifenilglicinas representan la principal clase de antagonistas para estos receptores (Moroni et al., 1997). Tal es el caso del RS-1-aminoindan-1,5-ácido dicarboxílico (AIDA) también conocido como UPF 523 el cuál muestra actividad preferentemente en los mGluR1 con una  $IC_{50}=251 \mu M$  sobre los mGluR5 con una  $IC_{50}>1mM$  (Moroni et al., 1997; Pellegrini-Giampetro et al., 1999).

### **3. Justificación y Pregunta de Investigación**

La hipótesis en la cual se postuló que el exceso en la liberación de glutamato protege por activación de los mGluR III, fue confirmada al activar selectivamente estos receptores con el agonista L-AP4. Con lo cual, se observó muy buena protección contra las crisis epileptiformes y la neurodegeneración. Esta protección es revertida al bloquear los mGluR III con antagonistas como el (R,S)- $\alpha$ -metil-serina-o-fosfato (MSOP) y el (S)-2-amino-2-metil-4-ácido fosfonobutanoico (MAP-4) (Vera, *manuscrito en preparación*).

Con base en estos trabajos, quisimos determinar el papel de los mGluR I en el proceso excitotóxico inducido por 4-AP en el hipocampo de ratas en libre movimiento. Ya que a diferencia de los mGluR III, se ha encontrado que su activación facilita la liberación de glutamato de



terminales nerviosas (Musante et al., 2008), generando daño celular en la región CA1 del hipocampo de ratas en libre movimiento (Camón et al., 1998), y que además funcionan como mediadores de actividad epileptiforme tanto en modelos *in vitro* (Karr y Rutecki, 2008; Stoop et al., 2003; Thuault et al., 2002) como *in vivo* (Camón et al., 1998; Tizzano et al., 1995).

De manera opuesta, se ha descrito que el bloqueo de los mGluR I incrementa la liberación de GABA (Cozzi et al, 2001), disminuye la actividad epileptiforme (Cozzi et al, 2001; Chapman et al., 1999), protege contra daño excitotóxico (Strasser et al., 1998) y lesión postraumática (Lyeth et al., 2001), previniene el daño neuronal inducido por privación de oxígeno-glucosa (Pellegrini-Giampetro et al., 1999), y curiosamente su inhibición incrementa la muerte apoptótica inducida por  $\beta$ -amiloide (Allen et al., 1999).

Por lo anterior, nuestra pregunta de investigación es:

1.- ¿La activación selectiva de los mGluRI, utilizando el agonista DHPG (RS-3,5-dihidroxifenilglicina), podrá potenciar los efectos neurotóxicos inducidos por la 4-AP?

2.- ¿El bloqueo selectivo de los mGluRI, utilizando el antagonista AIDA (RS-1-aminoindan-1,5-acido dicarboxilico), podrá disminuir el efecto neurotóxico generado por la 4-AP?



#### **4. Hipótesis**

Hipótesis 1:

La activación de los mGluRI, incrementará la liberación de glutamato, potenciará la neurodegeneración y las crisis epileptiformes inducidas por 4-AP, en el hipocampo de ratas en libre movimiento.

Hipótesis 2:

El bloqueo de los mGluRI, decrementará la neurodegeneración, las crisis epileptiformes y la liberación de glutamato inducido por 4-AP, en el hipocampo de ratas en libre movimiento.

#### **5. Materiales y Metodología**

##### **5.1. Microdiálisis**

Los experimentos del presente trabajo se llevaron a cabo empleando la técnica de microdiálisis. Esta técnica funciona a partir de un sistema cerrado en el que un tubo fino con una membrana de diálisis se inserta en una región determinada del encéfalo, produciéndose una transferencia pasiva de sustancias que cruzan la membrana de diálisis en virtud de un gradiente de concentración. Mediante esta técnica es posible estudiar con exactitud la liberación de neurotransmisores y estimar cambios en su concentración extracelular. Las variaciones son inducidas por diferentes drogas que se perfunden a través de la membrana de diálisis. Además de la administración local de



sustancias, la técnica de microdiálisis es compatible con otros estudios como el registro de la actividad eléctrica y la observación de las posibles alteraciones en la conducta, todo ello encontrándose el animal vivo, consciente y en libre movimiento (Rocha, 1997).

## **5.2. Sujetos**

Se emplearon ratas macho ( $n_{\text{total}} = 33$ ) de la cepa Wistar con peso aproximado de 220-230 g.

## **5.3. Diseño Experimental**

Se seleccionó un diseño de grupos independientes o de datos no correlacionados con tres o más tratamientos (Zinser, 1987). La concentración de los fármacos se eligió considerando su máxima eficacia, previamente descrita en la literatura (Cozzi et al., 2002; Karr y Rutecki, 2008; Moroni et al., 1997; Tizzano et al., 1995; Vera, 2004). Los grupos experimentales se puntualizan a continuación y en el siguiente apartado se describe mejor la administración de las drogas:

Grupo 1 (control).- administración de 4-AP (7 mM) en el hipocampo de rata, durante 12.5 minutos, equivalente a una fracción de microdiálisis. El tiempo subsecuente a la 4-AP fue considerado de recuperación y se perfundió solamente la solución Ringer.





Grupo 2.- administración intrahipocampal del agonista selectivo de los mGluR I, DHPG (1 mM), durante 100 minutos, equivalentes a 8 fracciones consecutivas de microdiálisis.

Grupo 3.- administración intrahipocampal del DHPG (1 mM) más 4-AP (7 mM) únicamente por 12.5 minutos (correspondientes a la fracción 6 de la microdiálisis), profundiendo el agonista solo el resto del tiempo.

Grupo 4.- administración intrahipocampal del antagonista de los mGluR I AIDA (1 mM) durante 100 minutos, equivalentes a 8 fracciones consecutivas de microdiálisis.

Grupo 5.- administración intrahipocampal del AIDA (1 mM) más 4-AP (7 mM), durante 12.5 minutos (correspondientes a la fracción 6 de la microdiálisis), dializando el antagonista solo el resto del tiempo.

#### **5.4. Cirugía y administración de las drogas.**

En el procedimiento experimental los animales fueron intervenidos quirúrgicamente con el fin de colocar una cánula-guía que proporciona el soporte para la posterior introducción de la cánula de microdiálisis y los electrodos que permitieron el registro de la señal eléctrica.

Los sujetos fueron anestesiados con halotano 0.5-1.5% en una mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. Una vez anestesiados, los animales fueron



colocados en un aparato de estereotaxia practicándoles un corte longitudinal en la piel del cráneo, se colocaron dos electrodos a nivel de corteza parietal para el posterior registro electroencefalográfico (EEG). Ambos electrodos fueron soldados al conector del amplificador e inmediatamente después tomando a Bregma como punto de referencia se establecieron las coordenadas del punto exacto de la región CA1 del hipocampo, las cuales son: AP = -3.6 mm, L = +2.4 mm y V = -2.0 mm (Paxinos y Watson, 1982). Una vez colocada la cánula-guía todos los elementos fueron fijados al cráneo con cemento acrílico dental.

Se permitió la recuperación de los animales en cajas individuales con agua y alimento *ad libitum* por un periodo aproximado de 5 días.

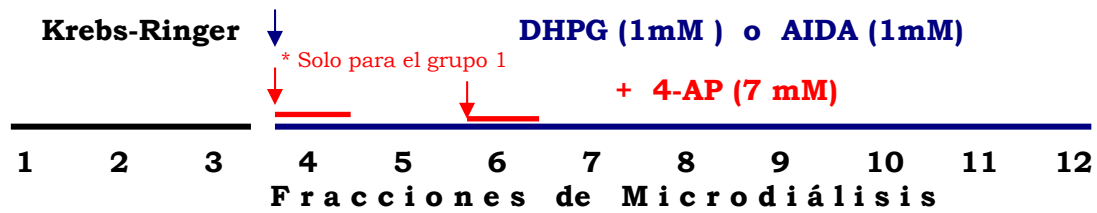
Llegado el día del experimento se intercambió la cánula-guía por la cánula de microdiálisis (CMA/12 de 2 mm de largo y 0.5 mm de diámetro, Solna Sweden) previamente lavada con agua bidestilada por 30 minutos a un flujo de 15  $\mu$ l/minuto. Una vez insertada la cánula de microdiálisis en el hipocampo se perfundió continuamente mediante una bomba de microinyección (CMA 400/Carnegie, Medicin) una solución Krebs Ringer oxigenada a un flujo constante de 2  $\mu$ l/minuto, con la siguiente composición (en mM): NaCl, 118; KCl, 4.5; MgSO<sub>4</sub>, 2.5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.0; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; NaHCO<sub>3</sub>, 25; y Glucosa (Ayala y Tapia, 2005).



Tras un periodo de estabilización de 60 minutos se colectaron automáticamente 12 muestras consecutivas en el microcolector de fracciones, cada una de ellas con un volumen final de 25  $\mu$ l, en un tiempo aproximado de 12.5 minutos, a un flujo constante de 2.0  $\mu$ l/min.

Junto con el medio de perfusión se administró, el agonista DHPG (1mM), el antagonista AIDA (1 mM), y la 4-AP (7 mM), solos o combinados de acuerdo al grupo experimental. En todos los casos, durante las 3 primeras fracciones de microdiálisis se perfundió el medio Krebs-Ringer y las muestras se consideraron de línea base. En el tiempo restante se administraron los diferentes compuestos y las muestras se consideraron experimentales o de recuperación, este último exclusivo del grupo 1. La Figura 4 esquematiza la administración de las drogas por microdiálisis.

La concentración de los compuestos fue seleccionada de acuerdo a trabajos previos (Cozzi et al, 2002; Karr y Rutecki, 2008; Moroni et al, 1997; Tizzano et al, 1995; Vera, 2004) en los cuales se observa la máxima eficacia para cada uno de ellos, considerando también que sólo del 7-11% de las drogas difunde de la cánula de microdiálisis al tejido circundante (Massieu et al., 1995; Morales-Villagran y Tapia, 1996).



**Figura 4.** Administración de fármacos por microdiálisis. Se esquematiza la perfusión del agonista DHPG y del antagonista AIDA durante 8 fracciones, solo o en presencia de 4-AP según el grupo. Las flechas señalan el inicio de la administración y las barras la permanencia. En el grupo 1 se perfundió únicamente 4-AP durante la fracción 4 y en el resto de las fracciones la solución Ringer, tal como se explica en el diseño experimental. Las fracciones fueron colectadas automáticamente cada 12.5 minutos con un volumen final de 25  $\mu$ l. En todos los experimentos se colectaron 12 muestras biológicas consecutivas. Durante las tres primeras fracciones se perfundió una solución Ringer y se consideraron muestras basales. Las fracciones restantes se consideraron muestras experimentales.

El contenido de las fracciones de microdiálisis se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detección por fluorescencia (Salazar et al., 1994), derivatizando cada muestra con el mismo volumen (25  $\mu$ l) de o-oftaldialdehído (OPA). Tres minutos después la solución fue inyectada en un cromatógrafo Beckman con una fase móvil de metanol y acetato de potasio (0.1 M, pH 5.5). La cuantificación de aminoácidos se realizó por comparación con una mezcla estándar que incluye: Ácido Aspártico, Ácido Glutámico, Glutamina, Glicina, Taurina, Alanina y GABA.

Es importante mencionar que la atención de nuestro análisis estuvo centrada en los ácidos aspártico y glutámico, por tratarse de aminoácidos excitadores; sin embargo, también se analizaron los demás aminoácidos como una medida de control sobre la adecuada



realización de nuestros experimentos, a excepción del GABA que con esta técnica no puede ser detectado en las muestras biológicas.

En todas las condiciones se comparó el promedio de las fracciones basales contra cada una de las fracciones experimentales. De este análisis quedaron excluidos aquellos sujetos cuyas muestras biológicas no fueron detectadas mediante la técnica empleada, lo cual obedece principalmente a la degradación de aminoácidos por variaciones en la temperatura, así como, por oscilaciones de voltaje en la fuente de corriente. La exclusión no se aplicó en los demás rubros medidos.

### **5.5. Registro EEG**

El registro electroencefalográfico (EEG) se llevó a cabo de manera simultánea con la microdiálisis empleando un amplificador y un polígrafo Grass 79D. La señal se filtró a un ancho de banda de 3-50 Hz. Adicionalmente, la señal eléctrica se digitalizó, utilizando un convertidor analógico/digital de 10 bits (resolución de 2 miliVolts) y una frecuencia de muestreo de 1 kHz. Los registros obtenidos fueron analizados usando el software científico Matlab (Mat works Inc. Versión 6.5)

Se determinó la latencia de la primera crisis y se cuantificó la amplitud de las espigas epileptiformes en una relación voltaje-tiempo al obtener el promedio del valor absoluto del voltaje de los datos a los minutos 30 y 60 siguientes a la administración de 4-AP o su



correspondiente en los grupos que recibieron un solo fármaco. Estos periodos se compararon con el promedio del valor absoluto del voltaje en un minuto de actividad basal.

También se analizó la frecuencia de las descargas epileptiformes al obtener los espectros de poder del EEG de los mismos minutos elegidos para analizar la amplitud. Un espectro de potencia nos permite identificar la intensidad (valor en el eje vertical) con la cual cada frecuencia (valores del eje horizontal) se encuentra presente en una señal eléctrica. El espectro de poder se obtuvo con una herramienta incluida en el software Matlab. Para su cuantificación se promediaron las frecuencias de 5 a 15 Hz por concentrarse entre ellas la mayor potencia, considerando también lo descrito por Medina-Ceja et al. (2008) quienes encontraron que la frecuencia de las descargas epileptiformes 20 minutos después de una inyección de 4-AP (10 nmol) en la región CA1 del hipocampo de ratas despiertas es de  $16.5 \pm 6.8$  Hz. Finalmente, se obtuvo la diferencia entre el promedio de las frecuencias a los 30 y 60 minutos posteriores a la administración de 4-AP o su equivalente en los grupos que no recibieron la 4-AP.

## **5.6. Observación Conductual**

Durante el experimento (2.30 hrs) se observó la ocurrencia de conducta convulsiva que fue medida por la incidencia e intensidad de convulsiones motoras. El grado de intensidad se determinó mediante una escala descriptiva modificada de Racine (1972) y Vucević (2008).



Es importante señalar que ambas escalas reúnen adecuados parámetros para evaluar la conducta convulsiva; sin embargo, únicamente al articularlas se describen mejor las características de la conducta observada en este estudio.

La escala está dividida en cinco estados progresivos (1=inmovilidad; 2=postura rígida, movimientos oscilatorios de la cabeza y movimientos masticatorios, 3=estereotipias (ej. acicalamiento constante y sacudidas de rata mojada) y mioclonias bilaterales de las extremidades anteriores, 4=sobresaltos, extensión tónica de las extremidades anteriores y de la cola, 5=*status epilepticus*), la calificación de los estados se asignó si se presentaba al menos uno de los signos mencionados.

### **5.7. Análisis Histológico**

Al término del experimento los animales permanecieron bajo observación y 24 horas después fueron anestesiadas con pentobarbital (2 ml, i.p.) practicándoles perfusión transcardiaca para la fijación de tejidos con 250 ml de NaCl (0.9%) seguidos de 250 ml de paraformaldehído (4% en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4). Al terminar este procedimiento, el cerebro fue removido y después de un periodo de postfijación en paraformaldehído (4%) durante 24 horas se sometieron a gradientes de sacarosa (10%, 20% y 30%) para la realización de cortes histológicos por congelación.

Se realizó una secuencia de cortes coronales del cerebro completo, en



donde fuera visible el tracto de la cánula. Cada corte tuvo un espesor de 50  $\mu\text{m}$ . Posteriormente fueron teñidos con violeta de cresilo para la visualización y conteo de células. Se analizaron los cortes de cinco ratas para cada condición experimental tomando de cada una de ellas tres cortes alternados.

La neurodegeneración se cuantificó a partir del conteo de células sanas en 30,000  $\mu\text{m}^2$  con un programa de análisis de imágenes NIH Image 1.6 empleando un microscopio NIKON y el objetivo de 20x. Se identificaron como células sanas aquellas con un diámetro mayor a 15  $\mu\text{m}$ , que presentaban citoplasma libre de núcleos picnóticos y en las cuales se observaran prolongaciones axónicas.

### **5.8. Análisis estadístico**

Para cuantificar los cambios en la concentración de aminoácidos extracelulares entre las muestras de línea base y las muestras experimentales, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas. Posteriormente, a partir de un análisis post hoc empleando la prueba Least Square Difference (LSD), se identificaron las diferencias estadísticamente significativas entre el promedio de la línea base y cada una de las muestras experimentales. Los datos de la neurodegeneración, así como, las variaciones en la amplitud y la frecuencia de los registros EEG, fueron sometidos a una prueba estadística t de Student. La significancia estadística se reportó con una  $p < 0.05$ .





Se realizó un análisis cualitativo de los cambios conductuales observados de acuerdo con la escala descriptiva modificada de Racine (1972) y Vučević (2008) (Ver Anexo 1) que se acompaña del video de cada condición experimental.

## **6. Resultados**

### **6.1. Controles Krebs Ringer**

En trabajos anteriores del laboratorio (Ramírez-Munguía et al., 2003) se estudió la concentración basal de los aminoácidos extracelulares de la región CA1 de ratas en libre movimiento cuando solamente se perfundió el medio Krebs-Ringer. Las concentraciones encontradas fueron (en pmolas/10  $\mu$ l): ácido aspártico, 2-6; ácido glutámico, 7-11; glutamina, 120-160; glicina y taurina, alrededor de 45; y alanina, 30. La actividad EEG se observó como actividad de baja frecuencia y baja amplitud que se mantiene constante durante 2.30 hrs. Esta actividad EEG basal se acompaña conductualmente de un estado de reposo casi permanente. Bajo estas condiciones no se observó daño celular en ninguna región del hipocampo (Vera, 2004).

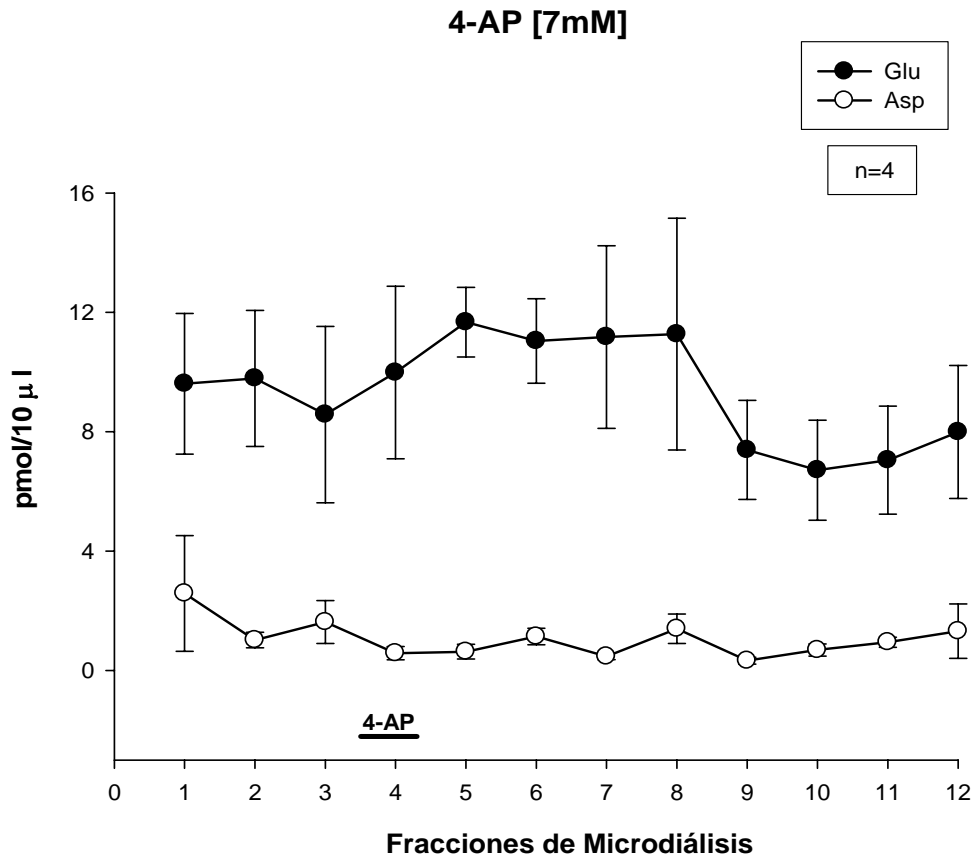
Para fines de este trabajo considerando nuestro objetivo, hipótesis y diseño experimental nos referimos a los controles Krebs Ringer solamente como un medio comparativo respecto a nuestros resultados, sin que se considere un grupo independiente dentro del diseño experimental, ni se incluye en el análisis de datos.



## 6.2. Administración de 4-AP

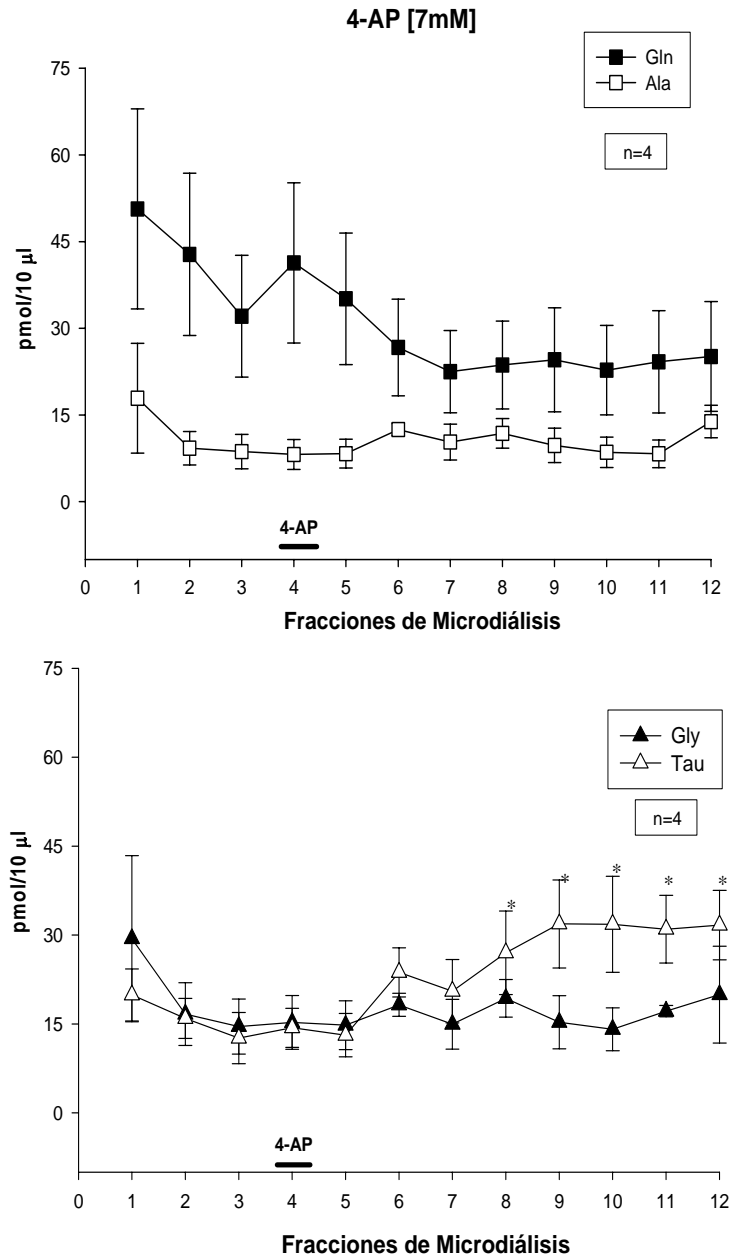
La administración de 4-AP (7 mM) durante una fracción de microdiálisis no generó aumento en la concentración extracelular de ácido glutámico, aunque se aprecia una tendencia de incrementar su concentración a partir de la fracción 4, que se mantuvo constante durante 4 fracciones más, y luego disminuyó por debajo de las fracciones basales. Ninguna de las variaciones llegó a ser estadísticamente significativa ( $F_{9,122}=1.58;p=0.17$ ). La concentración extracelular del ácido aspártico se mantuvo constante alrededor de su nivel basal, sin cambios estadísticamente significativos ( $F_{9,10}=1.01;p=0.45$ ) (Fig. 5).

En la Fig. 6 se muestran los datos de los otros aminoácidos. La glutamina presentó un decremento progresivo a partir de la fracción 4 que se mantuvo por debajo del nivel basal desde la fracción 7 hasta la fracción 12 aunque no es una diferencia estadísticamente significativa ( $F_{9,21}=3.90;p=0.11$ ). Por el contrario, la taurina sobrepasa sus niveles basales desde la fracción 6 y la diferencia respecto a su basal es estadísticamente significativa en las fracciones 8, 9, 10, 11 y 12 ( $F_{9,21}=7.15;p=0.001$ ). Mientras que la glicina y la alanina no presentan cambios estadísticamente significativos ( $F_{9,196}=0.66;p=0.73$ ) ( $F_{9,153}=1.20;p=0.33$ ).



**Figura 5.** Efecto de la perfusión de 4-AP (7mM) durante una fracción de microdiálisis (barra horizontal) sobre la concentración extracelular de glutamato (Glu) y aspartato (Asp) en el hipocampo de ratas en libre movimiento. Se presenta el promedio de los datos  $\pm$  E.S. de 4 ratas

En todas las ratas de este grupo fue posible observar en el EEG un patrón de descargas epileptiformes que se caracterizan por una etapa inicial de actividad hipersincrónica seguida de la aparición de trenes de espigas de alta frecuencia y voltaje hasta el establecimiento del estado epiléptico (Fig 7).



**Figura 6.** Efecto de la perfusión de 4-AP (7mM) durante una fracción de microdialisis (barra horizontal) sobre la concentración extracelular de glutamina (Gln), alanina (Ala), glicina (Gly) y taurina (Tau) en el hipocampo de ratas en libre movimiento. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. de 4 ratas  
\* estadísticamente significativo  $p < 0.001$



El promedio de latencia para la primer crisis en esta condición fue de 15.42 minutos siguientes a la 4-AP (n=7). En la Figura 7 se puede observar que el voltaje de espigas epileptiformes se duplica a los 30 minutos subsecuentes a la perfusión de la 4-AP, y para los 60 minutos la magnitud de la señal alcanza un incremento tres veces mayor respecto a la actividad basal.

En el espectro de potencia se aprecia que 30 minutos después de la perfusión de 4-AP, la mayor potencia de la señal se concentra entre los 3 y los 8 Hz. Mientras que 60 minutos después de su perfusión la mayor potencia se concentra entre los 5 y 10 Hz. Esto indica que existe un ligero incremento en la frecuencia de la señal, pero además se observa un incremento significativo en la potencia de la señal, lo cual es consistente con el incremento en amplitud. Las diferencias en la amplitud y en la frecuencia fueron estadísticamente significativas  $p < 0.01$  (Fig 7).

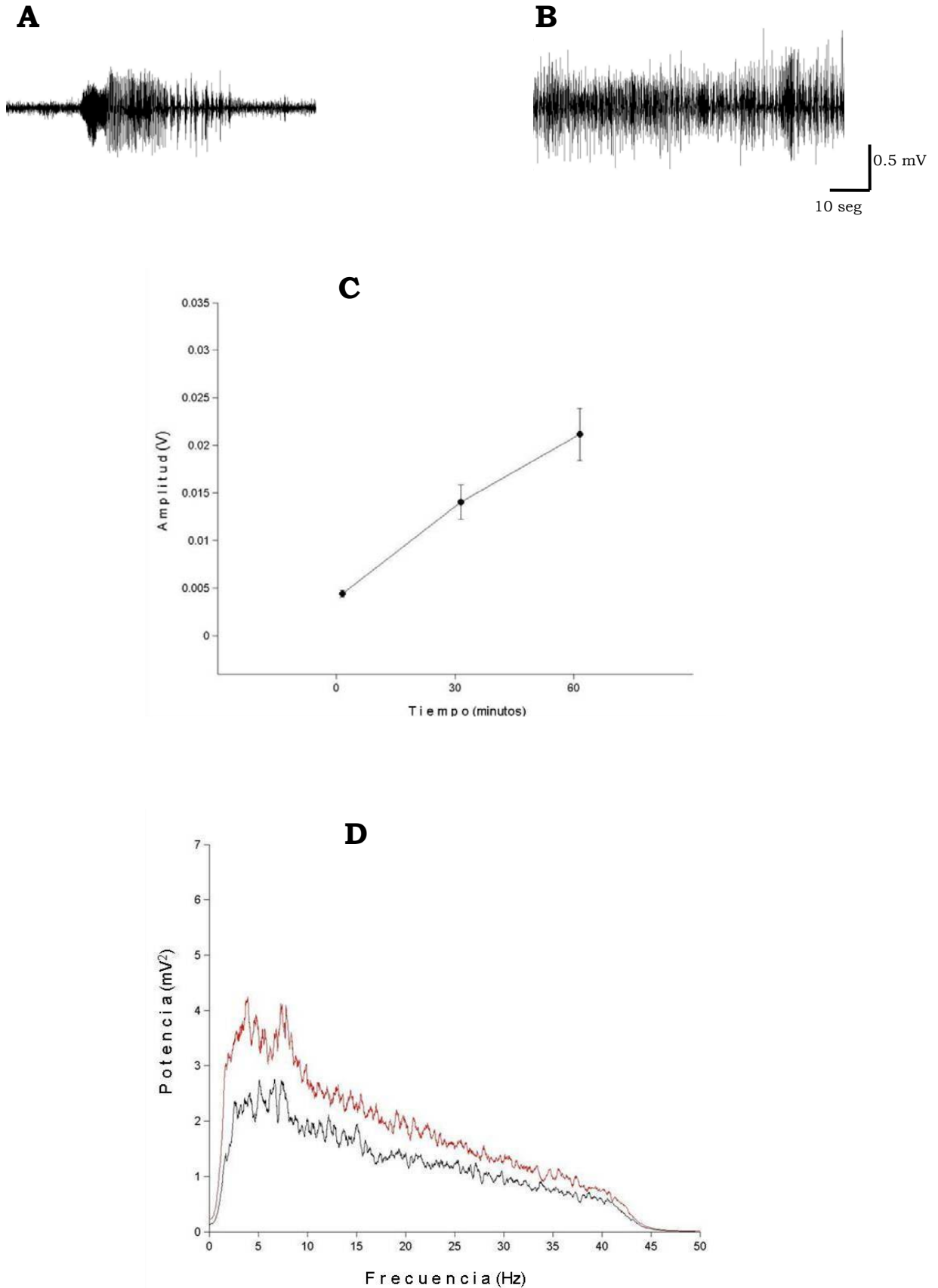
La 4-AP generó importantes alteraciones en la conducta de los animales que coincidían en tiempo con los cambios de la actividad eléctrica. Inicialmente se pudo observar espasticidad, mayor acicalamiento, movimientos masticatorios y sacudidas de rata mojada, características correspondientes a los estados 1 y 2 de la escala conductual.



Una vez establecido en el EEG el estado epiléptico, aproximadamente a los 40 minutos después de la administración de 4-AP, se observaron intensas sacudidas que involucraban el cuerpo completo del animal, movimientos tónico-clónicos de las extremidades anteriores (estado 3), postura encorvada y rigidez en la cola (estado 4), hasta llegar al *status epilepticus* que se acompañó de hipersalivación (estado 5). Estas características disminuyeron gradualmente hasta la recuperación del reposo, aproximadamente una hora después de concluir el experimento.

En la Figura 21 se agrupan las micrografías representativas del hipocampo de acuerdo al tratamiento. Se muestra la neurodegeneración provocada por la 4-AP respecto a las ratas tratadas con solución Ringer. Es notoria la presencia de abundantes núcleos picnóticos condensados en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, mientras que CA2 no se afecta.

En la gráfica de la figura 22 se resume la cuantificación de la neurodegeneración para todas las condiciones experimentales. Es clara la pérdida de células al administrar 4-AP comparando con la perfusión del medio Ringer.

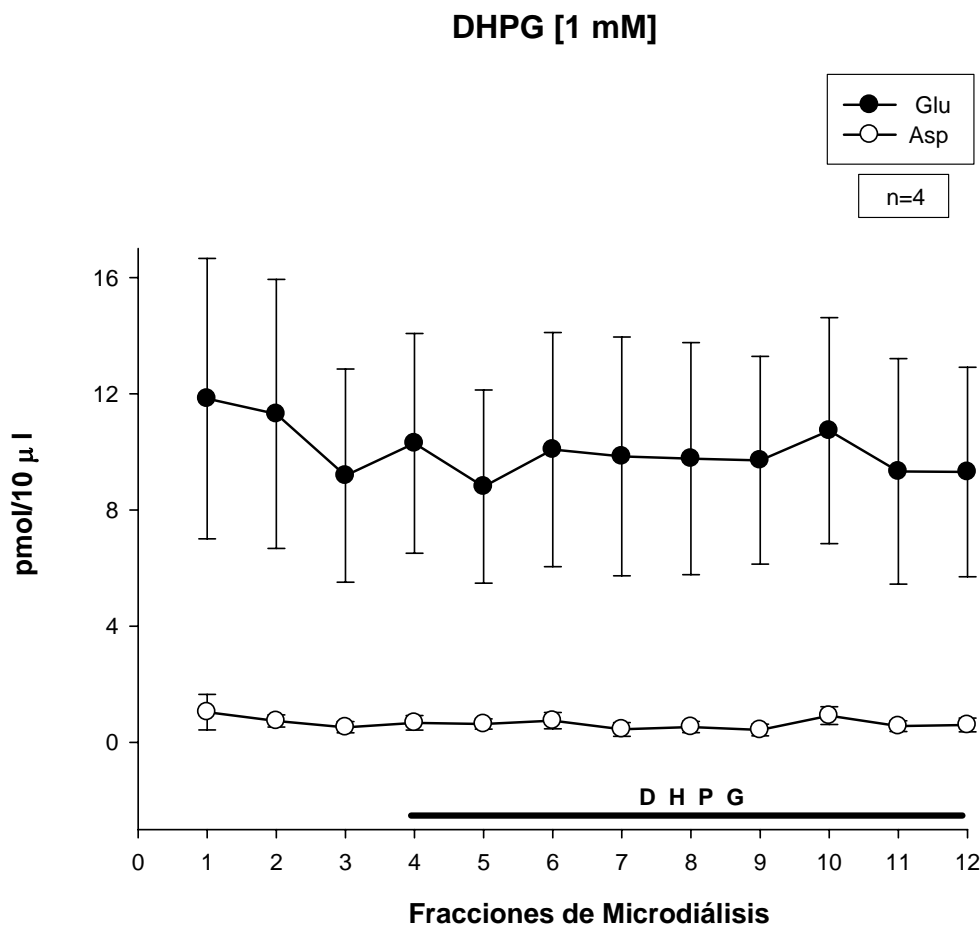


**Figura 7. A.** Trazo representativo de una rata tratada con 4-AP (7mM) a los 30 minutos después de su administración. **B.** Trazo representativo a los 60 minutos después de administrar la 4-AP, ambos trazos corresponden a la misma rata. **C.** Gráfica del promedio de la amplitud en el EEG de las ratas tratadas con 4-AP (n=7) en un minuto de fracción basal representado como tiempo cero, así como a los 30 y 60 minutos después de la 4-AP. **D.** Espectro de potencia que representa la participación de las frecuencias presentes en la señal eléctrica a los 30 (negro) y a los 60 (rojo) minutos posteriores a la 4-AP.



### 6.3. Activación de los mGluR I con el agonista DHPG

Al administrar el DHPG (1mM) durante nueve fracciones, se observó que la concentración extracelular de glutamato y aspartato permanece sin variaciones, por lo que no se presentan cambios estadísticamente significativos ( $F_{9,17}=0.69;p=0.71$ ) y ( $F_{9,11}=0.97;p=0.47$ ) (Fig 8).



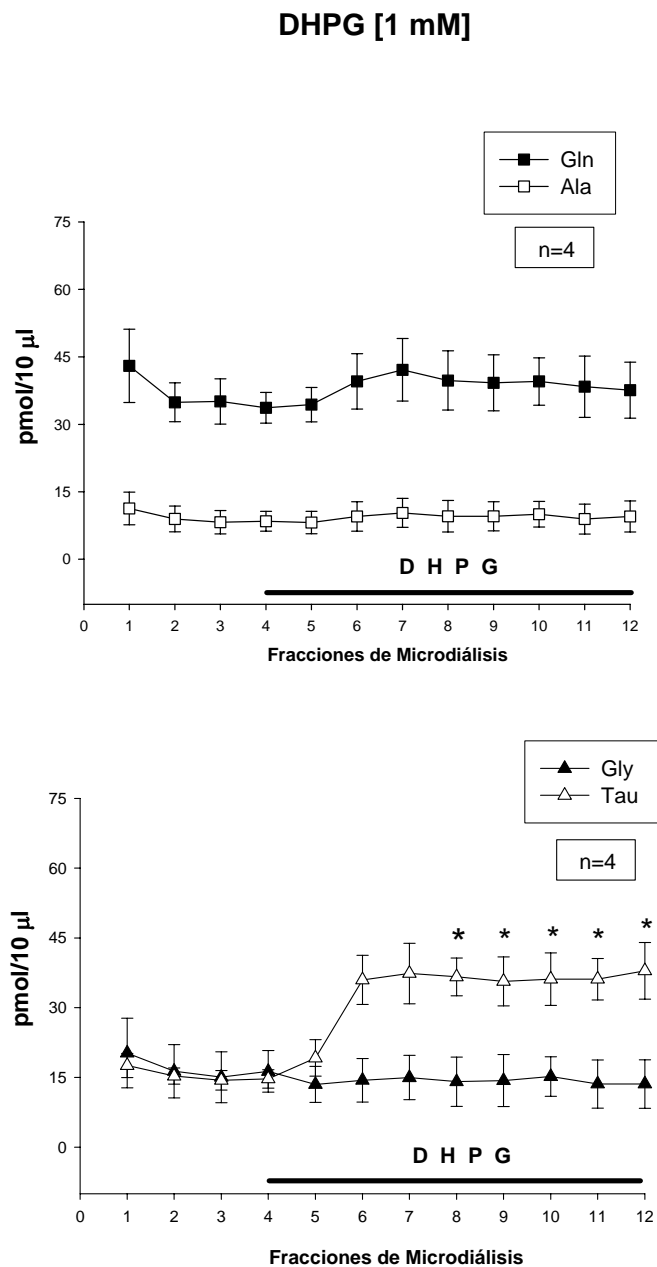
**Figura 8.** Efecto de la perfusión de DHPG (1mM) durante 9 fracciones consecutivas (barra horizontal) sobre la concentración extracelular de aspartato y glutamato en el hipocampo de ratas en libre movimiento. Se presenta el promedio de los datos  $\pm$  E.S. de 4 ratas

Tampoco se observan variaciones significativas en la concentración extracelular de glutamina ( $F_{9,29}=1.86;p=0.08$ ), glicina ( $F_{9,69}=1.36;p=0.24$ ) ni alanina (Fig 9). Por el contrario, la taurina





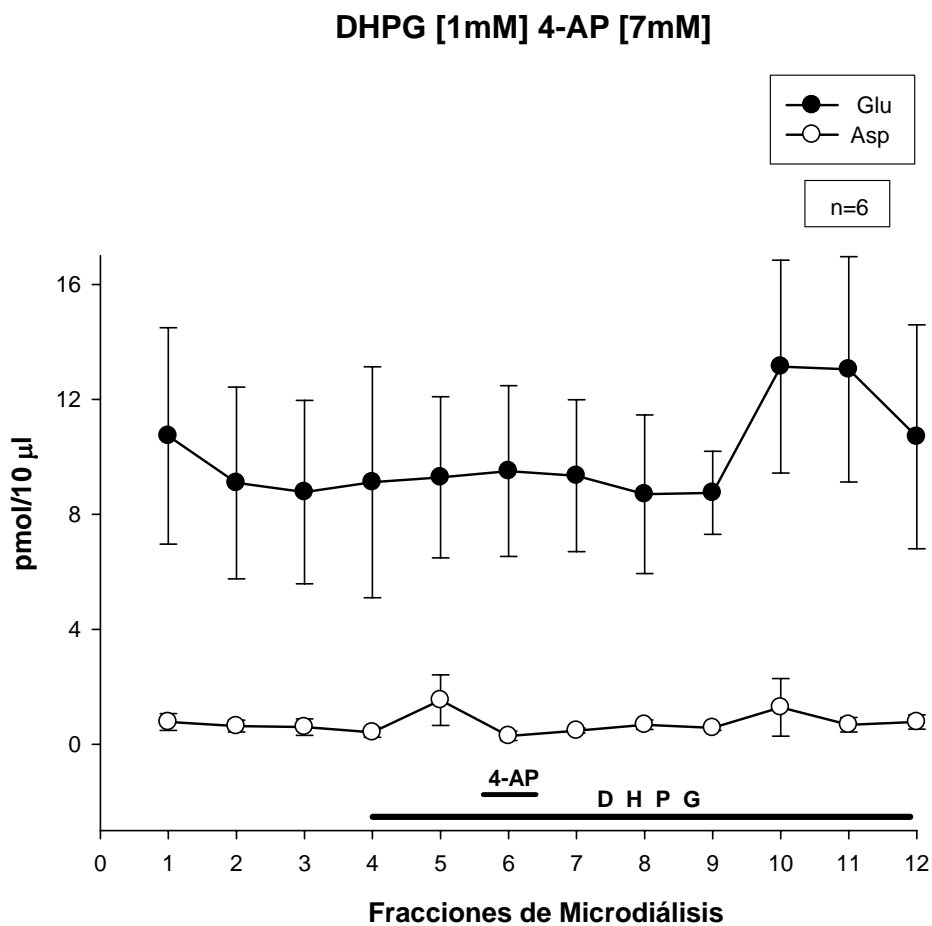
mostró un incremento de su concentración extracelular a partir de la fracción 6 que se mantiene hasta la fracción 12, encontrando diferencias estadísticamente significativas ( $F_{9,475}=6.65;p=0.01$ ) en las fracciones 8, 9, 10, 11 y 12, respecto al promedio basal (Fig 9).



**Figura 9.** Efecto de la perfusión de DHPG (1 mM) durante 9 fracciones consecutivas (barra horizontal) sobre la concentración extracelular glutamina (Gln), alanina (Ala), glicina (Gly) y taurina (Tau) en el hipocampo de ratas en libre movimiento. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. de 4 ratas  
\* significativo  $p < .05$  respecto al promedio de las muestras basales.



La coperfusión del DHPG durante nueve fracciones más una fracción con 4-AP generó una tendencia a incrementar la concentración de glutamato en la fracción 10 que se mantuvo en la fracción 11 y decae en la 12; sin embargo, nos son variaciones estadísticamente significativas ( $F_{9,38}=0.63;p=0.76$ ). La concentración de aspartato aumentó en la fracción 5 y se mantiene constante hasta el término del registro sin diferencias estadísticamente significativas ( $F_{9,42}=0.79;p=0.61$ ) (Fig 10).



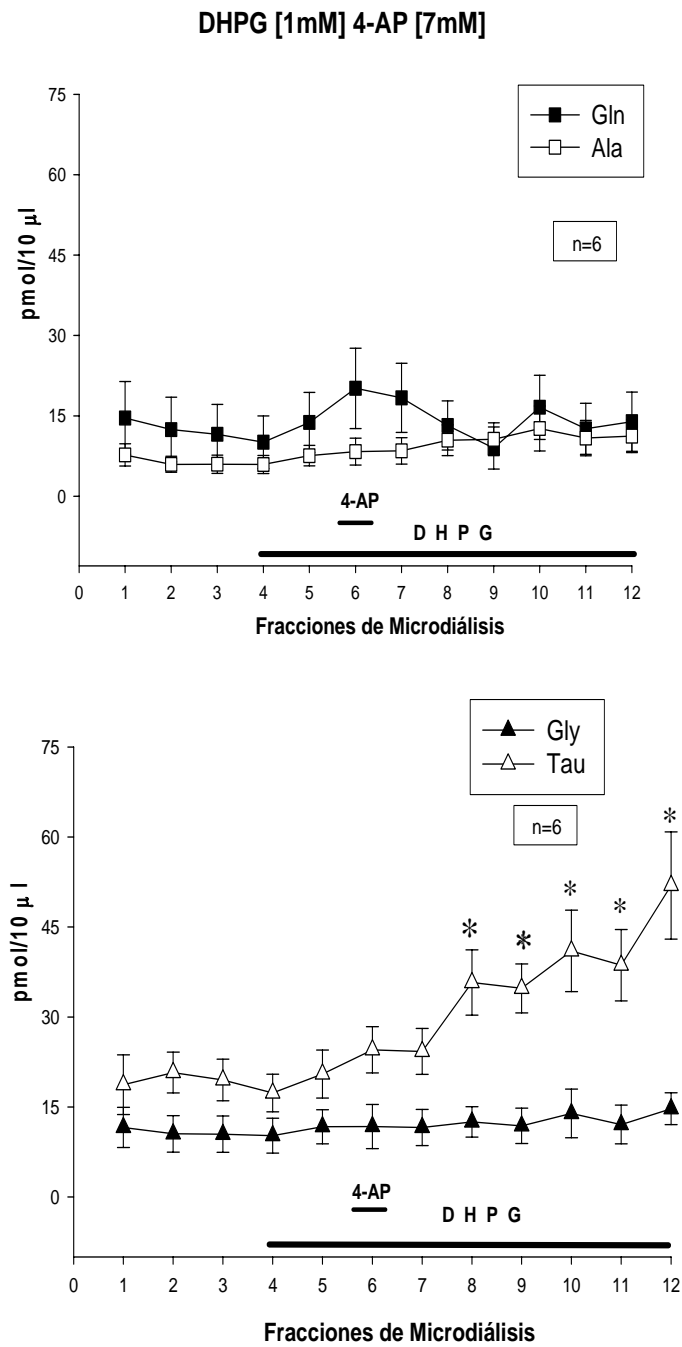
**Figura 10.** Efecto de la coperfusión de 4-AP (7 mM) y DHPG (1 mM) sobre la concentración extracelular de aspartato (Asp) y glutamato (Glu) en el hipocampo de ratas en libre movimiento. La 4-AP se perfundió durante una fracción y el DHPG durante nueve fracciones, como indican las barras horizontales. Se presenta el promedio de los datos + E.S. de 6 ratas. El incremento de glutamato extracelular no es significativo  $p=0.65$



La glutamina, la glicina y la alanina no presentaron cambios estadísticamente significativos: ( $F_{9,64}=2.01;p=0.60$ ), ( $F_{9,96}=1.20;p=0.31$ ) y ( $F_{9,263}=3.93;p=0.11$ ) respectivamente.

Mientras que la taurina incrementó desde la fracción 8 y alcanzó una concentración tres veces mayor que su nivel basal en la última fracción, esta significancia estadística alcanza una  $p<0.01$  ( $F_{9,68}=12.91;p=0.001$ ) (Fig 11).

En la figura 12 se observa que la actividad eléctrica de las ratas tratadas con DHPG solo ( $n=6$ ) no se altera. El trazo representativo para esta condición se mantiene constante durante todo el experimento. Se observan ondas de baja frecuencia concentradas entre 3 y 8 Hz con potencia no mayor a 1.5 mV<sup>2</sup>. Su amplitud promedio se mantiene alrededor de los 8 mV en las tres diferentes mediciones de tiempo. Para obtener estos datos se promedió un minuto de registro de cada una de las ratas. El tiempo cero indica el promedio de un minuto de actividad basal. Además, se muestran en la gráfica los minutos 30 y 60, que para ésta condición, son el tiempo análogo del tomado en el grupo al que se coadministró la 4-AP con el agonista (Fig 12). La conducta de este grupo experimental no se ve afectada y de forma similar a las ratas perfundidas con Krebs-Ringer permanecen predominantemente en estado de reposo.



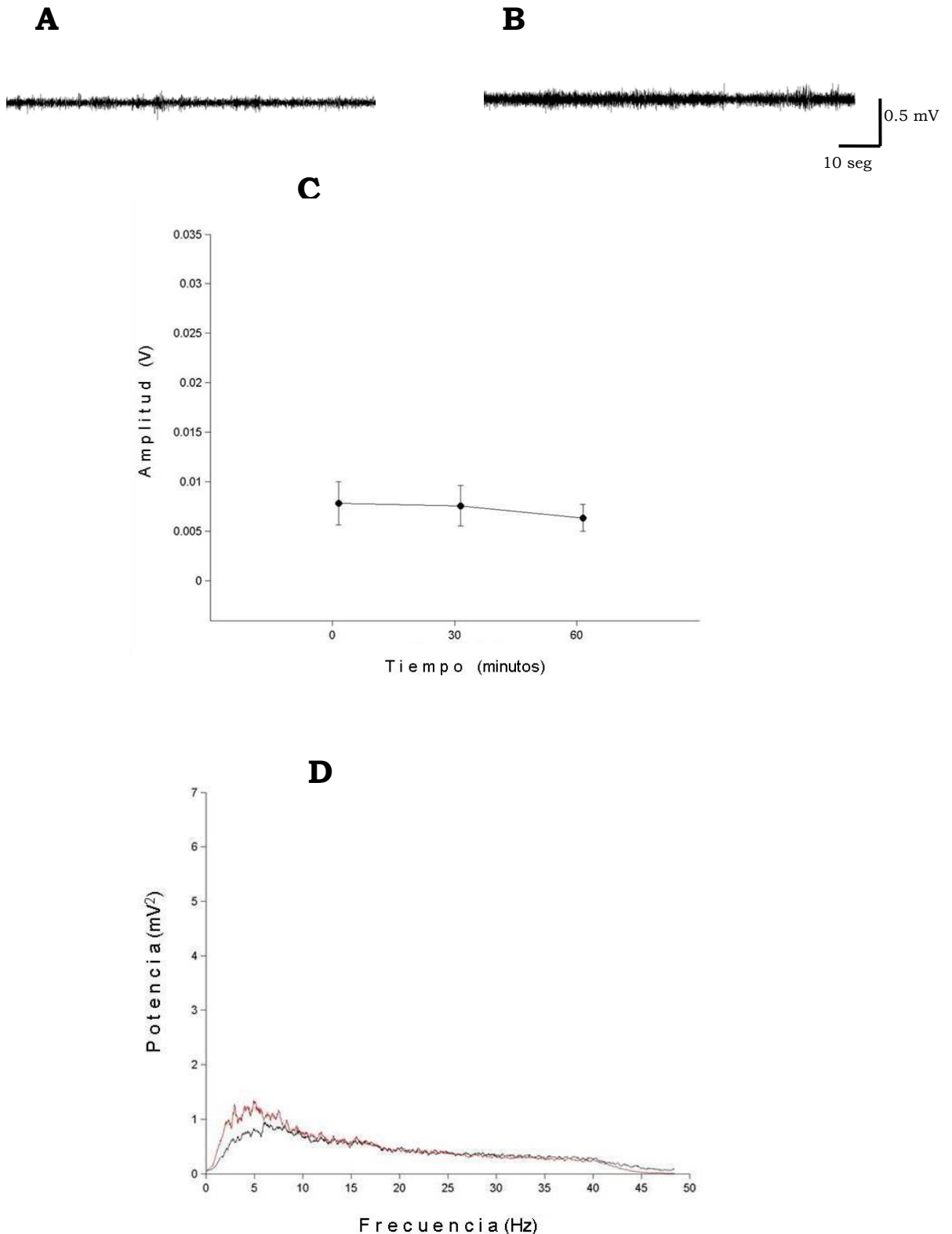
**Figura 11.** Efecto de la perfusión de 4-AP (7 mM) y DHPG (1 mM) sobre la concentración extracelular de glutamina (Gln), alanina (Ala), glicina (Gly) y taurina (Tau) en el hipocampo de ratas en libre movimiento. La 4-AP se perfundió durante una fracción y el DHPG durante nueve fracciones, tal como se indica con las barras horizontales. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. \* $p < 0.001$  con respecto al promedio de las fracciones basales.



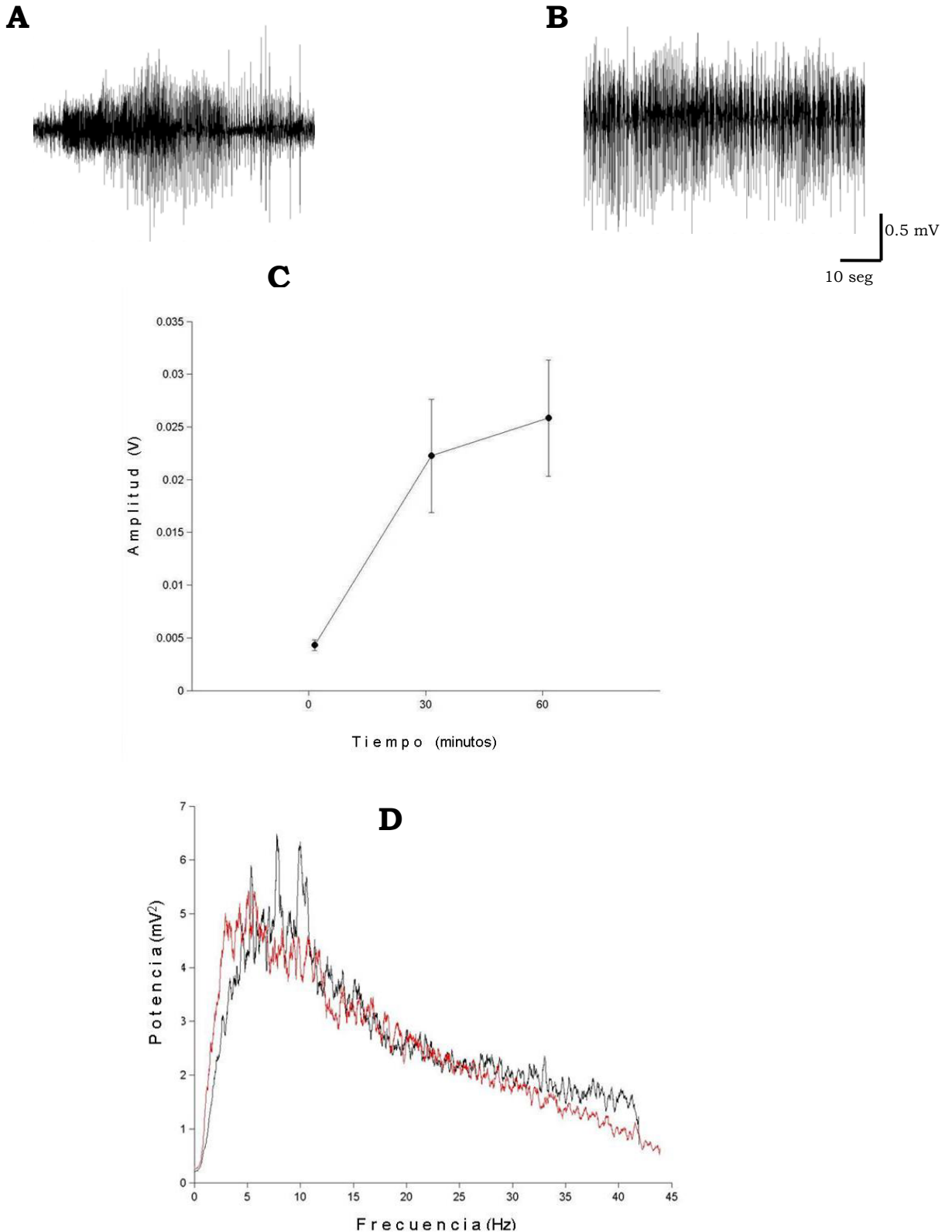
Por el contrario, la actividad EEG del grupo tratado con DHPG (1mM) más 4-AP (7mM) (Fig 13) muestra variaciones minutos después de la copperfusión. La latencia de la primer crisis fue a los 14.71 minutos. La amplitud de las crisis epileptiformes generadas en esta condición experimental aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ) de 5 mV, en condiciones basales, a 20 y 25 mV, 30 y 60 minutos siguientes a la 4-AP, respectivamente. En el espectro de potencia no se distinguen cambios en los períodos de los 30 y 60 minutos (Fig 13). El 100% de estos animales ( $n=7$ ) alcanzó el estado 5 de la escala descriptiva pero se mantuvo mayor tiempo en *status epilepticus*, aproximadamente 1.30 horas después de concluir el registro.

En la Figura 21 es posible apreciar que la administración del DHPG solo no causó neurodegeneración. Contrariamente en la micrografía representativa de una rata tratada con DHPG más 4-AP se observan numerosos núcleos picnóticos que se extienden sobre las regiones de CA1 y CA3, sin daño en la región de CA2.

El número de células sanas del grupo tratado con DHPG es igual al del tratado con solución Krebs Ringer. Mientras que la pérdida neuronal del grupo tratado con DHPG más 4-AP es mayor a la del grupo tratado con 4-AP sola, ésta diferencia es estadísticamente significativa (Fig 22).



**Figura 12.** **A.** Trazo representativo de una rata tratada con DHPG (1mM) a los 60 minutos después de su administración, tiempo equivalente a 30 minutos después de 4-AP en la fracción 6. **B.** Trazo representativo a los 90 minutos después de la perfusión del DHPG, tiempo equivalente a 60 minutos después de 4-AP en la fracción 6, ambos trazos corresponden a la misma rata. **C.** Gráfica del promedio del valor absoluto de la amplitud de las ratas tratadas con DHPG (1mM) (n=6) en un minuto de la segunda fracción basal representada como tiempo cero, y en los minutos 30 y 60 equivalentes al tratamiento con 4-AP. **D.** Espectro de potencia que representa la frecuencia de la señal eléctrica a los 60 (negro) y a los 90 (rojo) minutos después del DHPG, este tiempo también equivale al tomado en el tratamiento con 4-AP.

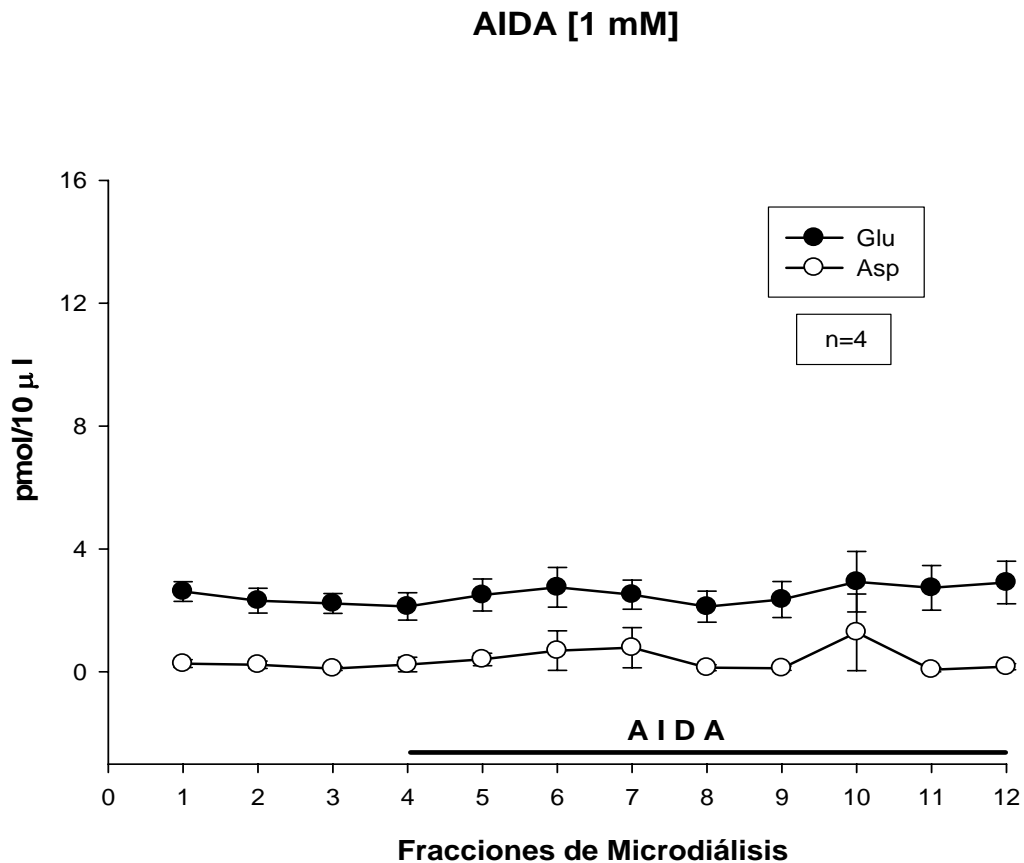


**Figura 13.** **A.** Trazo representativo de una rata tratada con DHPG (1mM) durante nueve fracciones mas una fracción de 4-AP (7mM) a los 30 minutos después de la coadministración. **B.** Trazo representativo a los 60 minutos después de la perfusión del DHPG más la 4-AP, ambos trazos corresponden a la misma rata. **C.** Gráfica del promedio del valor absoluto de la amplitud de las ratas tratadas con DHPG (1mM) mas 4-AP (7mM) (n=7) en un minuto de fracción basal representado como tiempo cero, así como a los 30 y 60 minutos después de la coadministración. **D.** Espectro de potencia que representa la frecuencia de la señal eléctrica a los 30 (negro) y a los 60 (rojo) minutos después del DHPG mas la 4-AP.



#### 6.4. Bloqueo de los mGluRI con el antagonista AIDA

La perfusión del AIDA (1 mM) durante nueve fracciones consecutivas no generó cambios estadísticamente significativos en la concentración extracelular del ácido aspártico ( $F_{9,12}=0.71;p=0.68$ ) ni del ácido glutámico ( $F_{9,3.56}=0.69;p=0.70$ ).



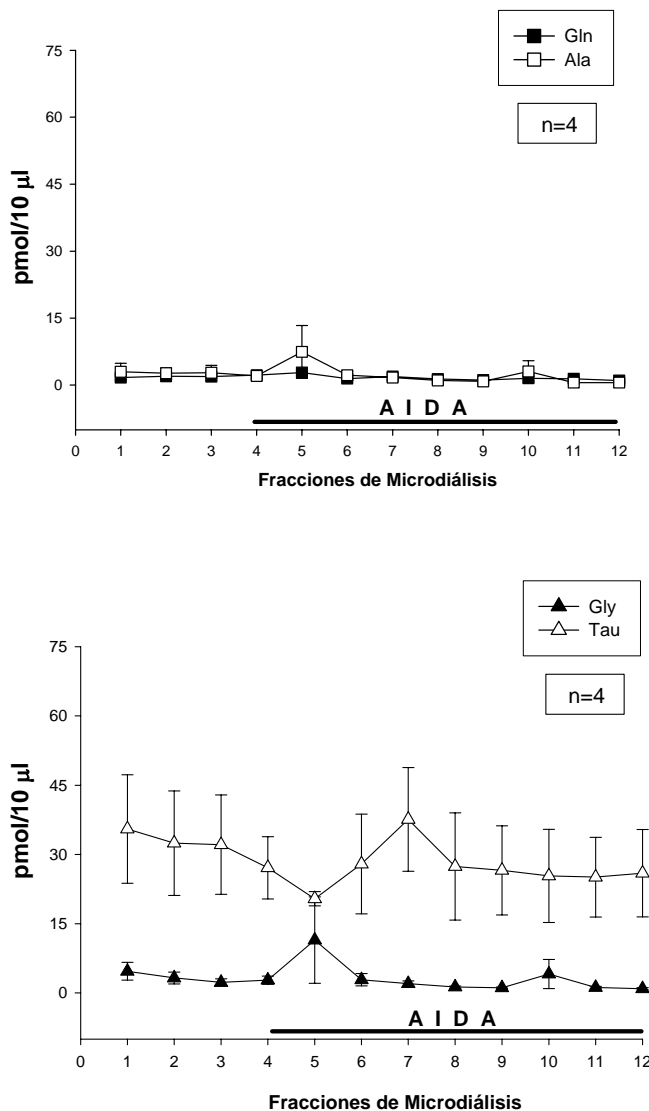
**Figura 14.** Efecto de la perfusión de AIDA (1 mM) durante nueve fracciones consecutivas sobre la concentración extracelular de glutamato (Glu) y aspartato (Asp) en el hipocampo de ratas en libre movimiento. Se presenta el promedio de los datos  $\pm$  E.S. de 4 ratas





De igual forma los niveles extracelulares de glutamina ( $F_{9,10}=1.83;p=0.10$ ), glicina ( $F_{9,35}=1.08;p=0.40$ ) y alanina ( $F_{9,148}=1.04;p=0.43$ ) permanecen sin cambios estadísticamente significativos, aunque en la fracción 5 coincidentemente los tres aminoácidos aumentan.

### AIDA [1 mM]



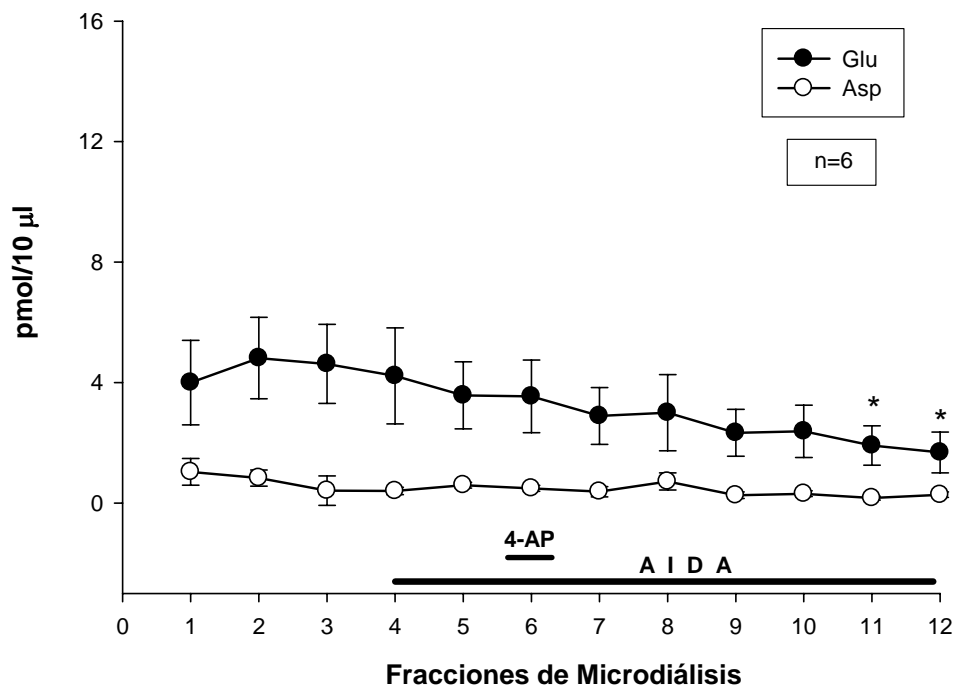
**Figura 15.** Efecto de la perfusión de AIDA (1 mM) durante nueve fracciones de microdiálisis (barra horizontal) sobre la concentración extracelular de glutamina (Gln), alanina (Ala), glicina (Gly) y taurina (Tau) en el hipocampo de ratas en libre movimiento. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. de 4 ratas



En esta misma fracción la taurina cayó por debajo de su nivel basal, aumenta en la fracción 7 y se estabiliza desde la fracción 8 hasta concluir la colecta, estas variaciones tampoco resultaron estadísticamente significativas ( $F_{9,80}=0.39;p=0.92$ ) (Fig 15).

En la Figura 16 se puede ver que la combinación de AIDA más una fracción de 4-AP disminuyó progresivamente la concentración extracelular de glutamato, siendo estadísticamente diferentes ( $F_{9,54}=3.41;p=0.002$ ), solamente las fracciones 11 y 12. El aspartato no mostró susceptibilidad de aumentar su concentración como ocurrió al administrarse el antagonista solo ( $F_{9,3,94}=2.75;p=0.10$ ).

#### AIDA [1mM] 4-AP [7mM]

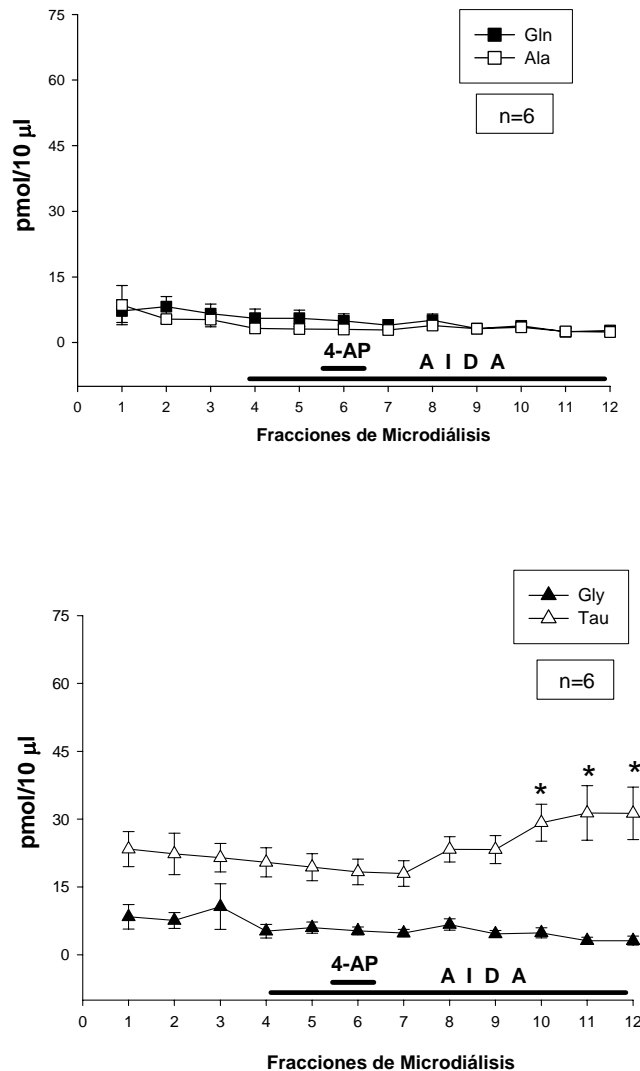


**Figura 16.** Efecto de la coperfusión de 4-AP (7 mM) y AIDA (1 mM) sobre la concentración extracelular de aspartato (Asp) y glutamato (Glu) en el hipocampo de ratas en libre movimiento. La 4-AP se perfundió durante una fracción y el DHPG durante nueve fracciones, como lo indican las barras horizontales. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. de 6 ratas.  
\* significativo  $p < 0.01$  con respecto al promedio de las muestras basales



Nuevamente el resto de aminoácidos permanecieron alrededor de su nivel basal. A excepción de la taurina que aumentó progresivamente desde la fracción 8. Las diferencias estadísticamente significativas se encontraron sólo, en las fracciones 10, 11 y 12 ( $F_{9,167}=2.09;p=0.046$ ), con respecto al promedio de la línea base (Fig 17).

### AIDA [1mM] 4-AP [7mM]



**Figura 17.** Efecto de la coperfusión de 4-AP (7 mM) y AIDA (1 mM) sobre la concentración extracelular de glutamina (Gln), alanina (Ala), glicina (Gly) y taurina (Tau) en el hipocampo de ratas en libre movimiento. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. de 6 ratas.  
\* significativo  $p < .05$  respecto al promedio de las muestras basales



La perfusión de AIDA no promovió cambios en la actividad EEG, ni en la conducta normal de los animales (n=6). La frecuencia osciló entre 3-8 Hz con una potencia no mayor a  $1.2 \text{ mV}^2$  y la amplitud se mantiene alrededor de 5 mV en las tres diferentes mediciones de tiempo (Fig. 18). Al igual que con el agonista solo, los minutos 30 y 60 son equivalentes a la coadministración con 4-AP en la fracción 6.

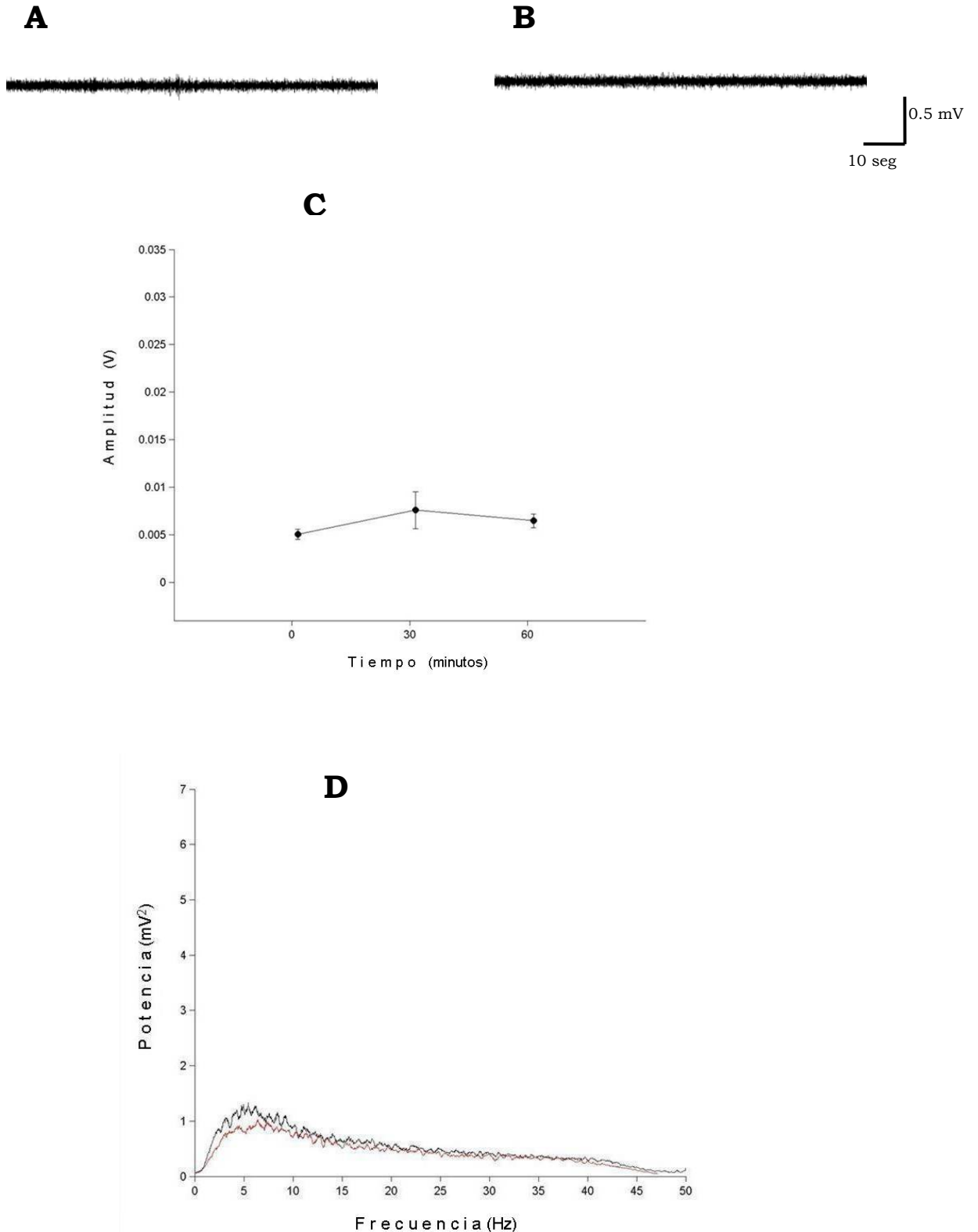
Por el contrario, en el grupo tratado con AIDA más 4-AP, sí se observó actividad epileptiforme (Fig. 19). El promedio de latencia para la primer crisis fue de 16 minutos (n=7). La amplitud de las espigas incrementó significativamente ( $p < 0.01$ ) su basal a los 30 y 60 minutos siguientes a la 4-AP, llegando a ser 3 veces mayor en este último minuto. En el espectro de poder, se observa que la mayor potencia tanto a los 30 como a los 60 minutos posteriores a la infusión de 4-AP, se concentra entre 5-10 Hz. Aunque electroencefalográficamente se estableció el estado epiléptico, es importante señalar, que el 100% de sujetos de ésta condición, alcanzó solamente el estado 4 de nuestra escala conductual, y también se redujo el tiempo de recuperación a 30 minutos después de concluir el experimento, en comparación con los otros dos grupos tratados con 4-AP.



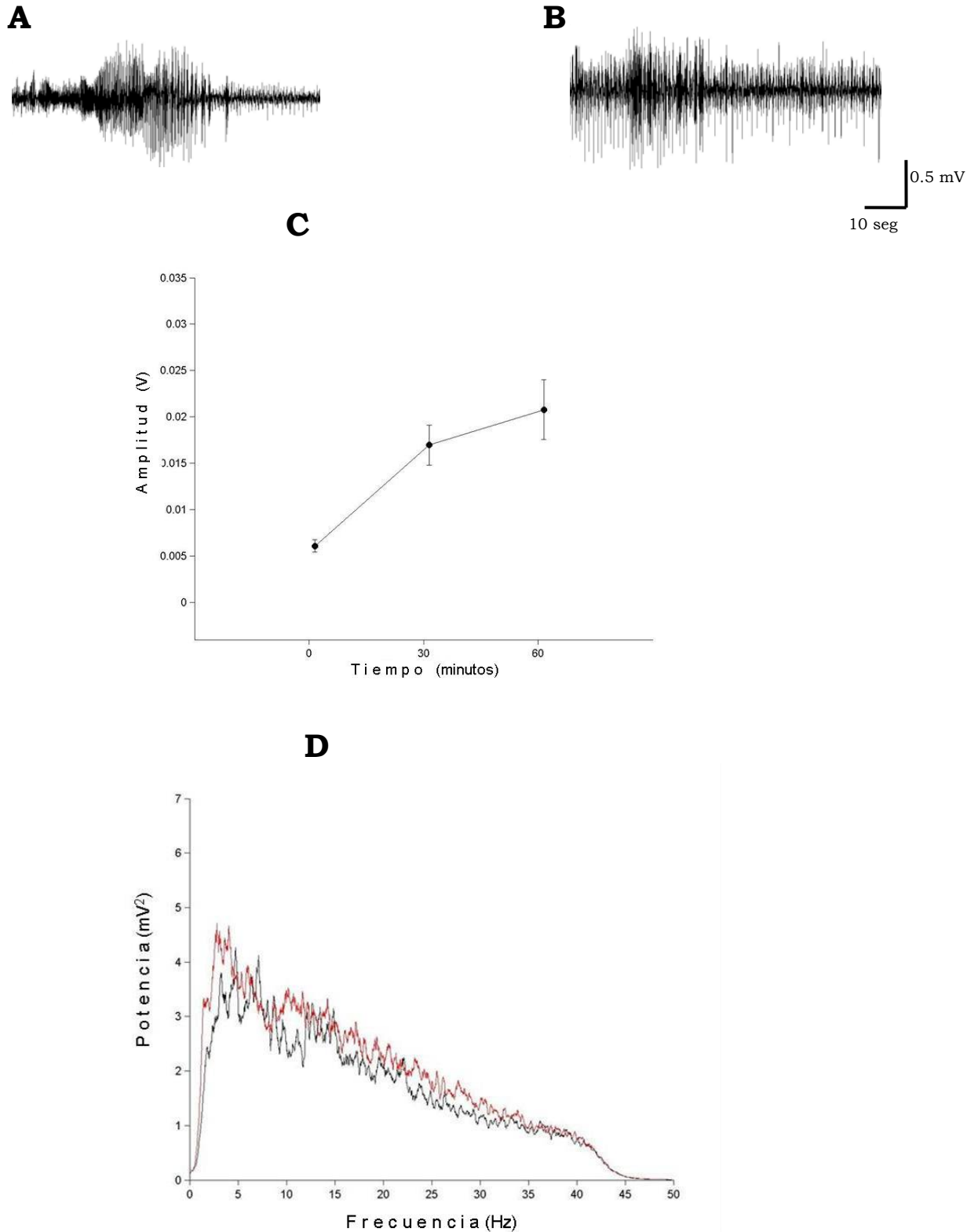
---

En la Figura 20 se muestra la comparación de los cambios en la frecuencia y la amplitud de los tres grupos tratados con 4-AP.

En la Figura 21 se observa que la perfusión de AIDA solo no produce daño celular, mientras que la coadministración de AIDA mas 4-AP si genera daño celular en la región CA1 y CA3 apreciándose núcleos picnóticos sobre estas regiones, dejando libre de daño el área CA2. La cantidad de células sanas en el hipocampo ipsilateral de las ratas tratadas con AIDA es igual al de los grupos tratados con Krebs Ringer y con DHPG lo cual muestra que en nuestro modelo ni el DHPG ni el AIDA son tóxicos (Fig 22). Se observa también que existe un mayor número de células sanas en el grupo al que se administró AIDA mas 4-AP respecto a las tratadas con 4-AP sola, esta diferencia es estadísticamente significativa (Fig 22).



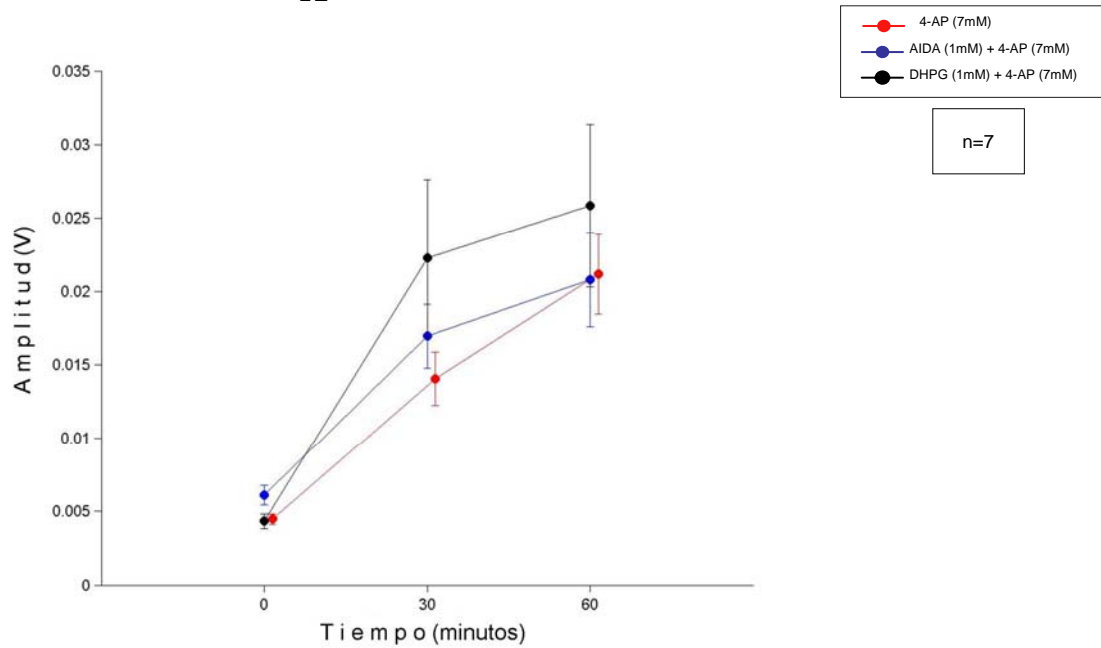
**Figura 18. A.** Trazo representativo de una rata tratada con AIDA (1mM) a los 60 minutos después de su administración. **B.** Trazo representativo a los 90 minutos después de la perfusión del AIDA, ambos trazos corresponden a la misma rata. **C.** Gráfica del promedio del valor absoluto de la amplitud de las ratas tratadas con AIDA (1mM) (n=6) en un minuto de la segunda fracción basal representada como tiempo cero, y en los minutos 30 y 60 equivalentes al tratamiento con 4-AP. **D.** Espectro de potencia que representa la frecuencia de la señal eléctrica a los 60 (negro) y a los 90 (rojo) minutos después del DHPG, este tiempo también equivale al tomado en el tratamiento con 4-AP.



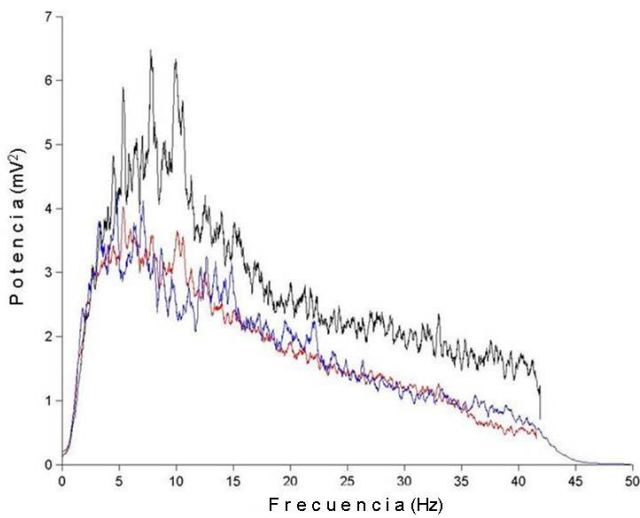
**Figura 19.** **A.** Trazo representativo de una rata tratada con AIDA (1mM) durante nueve fracciones mas una fracción de 4-AP (7mM) a los 30 minutos después de la coadministración. **B.** Trazo representativo a los 60 minutos después de la perfusión del AIDA más la 4-AP, ambos trazos corresponden a la misma rata. **C.** Gráfica del promedio de la amplitud de las ratas tratadas con AIDA (1mM) mas 4-AP (7mM) (n=7) en un minuto de fracción basal representado como tiempo cero, así como a los 30 y 60 minutos después de la coadministración. **D.** Espectro de potencia que representa la frecuencia de la señal eléctrica a los 30 (negro) y a los 60 (rojo) minutos después del AIDA mas la 4-AP.



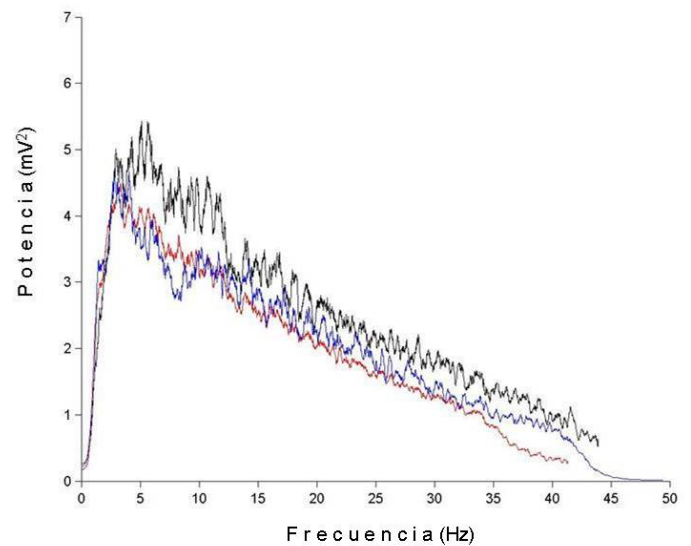
**A**



**B**



**C**



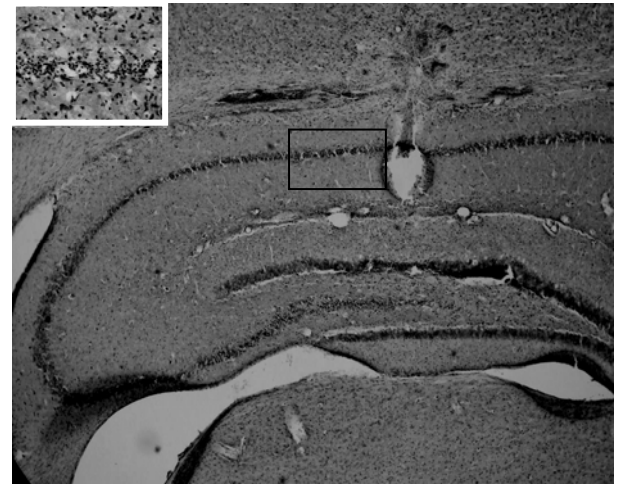
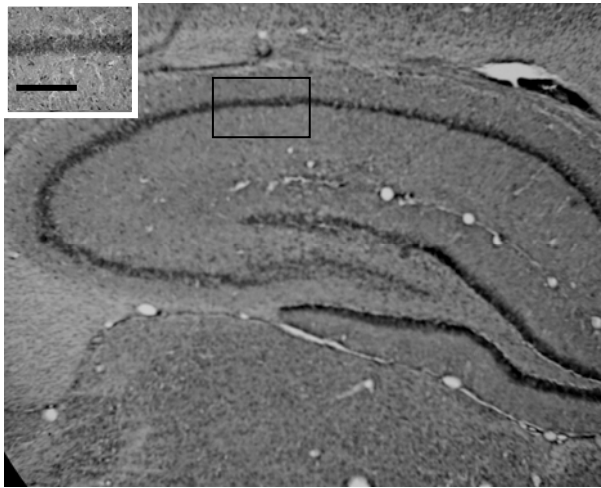
**Figura 20.** En **A** se muestra la gráfica comparativa del promedio de la amplitud de las ratas tratadas con 4-AP (7mM) y al combinarla con AIDA (1mM) o con DHPG (1mM), el cero representa un minuto de fracción basal, también se muestra el promedio de los minutos 30 y 60 siguientes a la administración de la 4-AP. En **B** y **C** se compara el espectro de potencia a los 30 y 60 minutos respectivamente para los grupos tratados con 4-AP en rojo, DHPG + 4-AP en negro y AIDA + 4-AP en azul. En todos los casos la  $n=7$ .





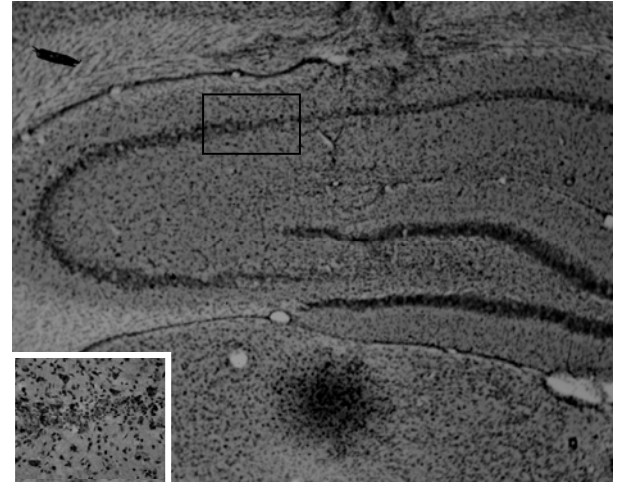
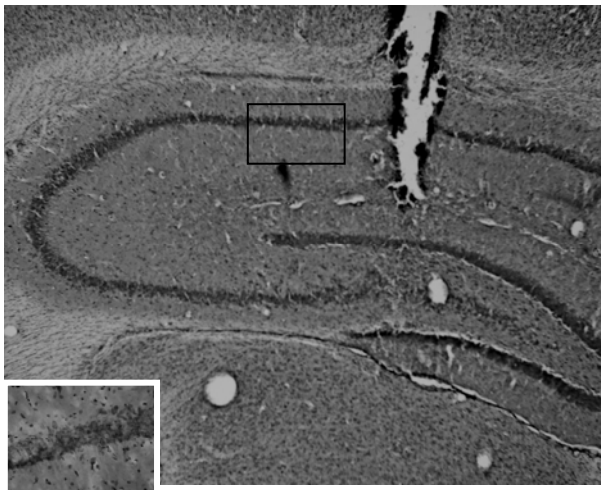
**Krebs-Ringer**

**4-AP [7 mM]**



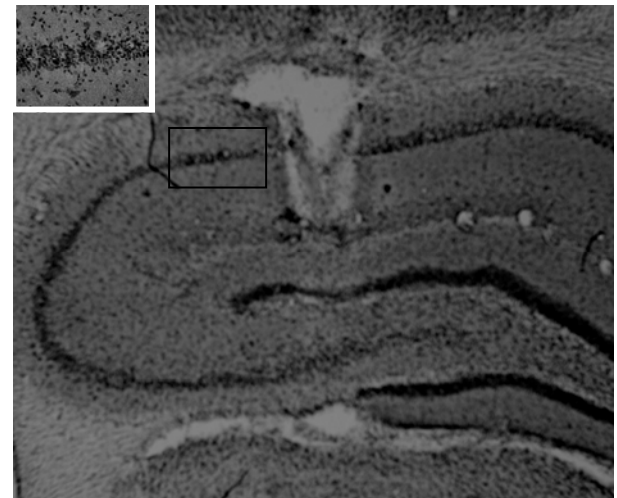
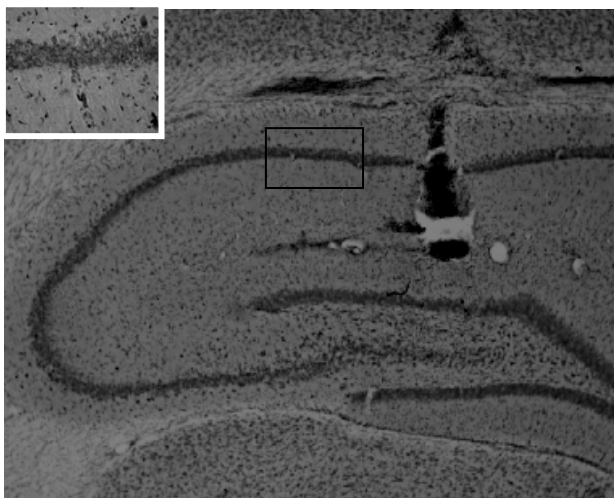
**DHPG [1 mM]**

**DHPG + 4-AP**

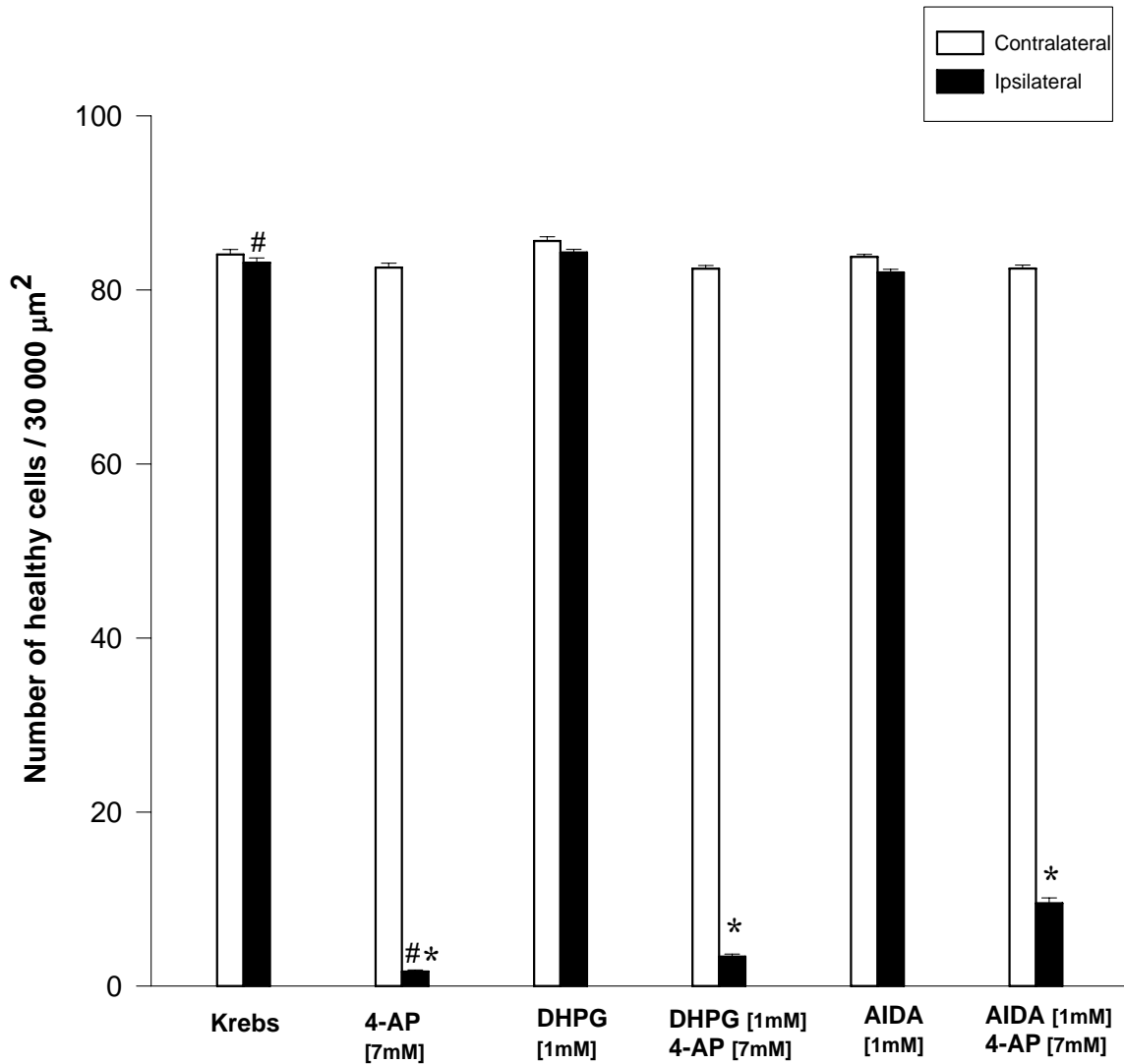


**AIDA [1 mM]**

**AIDA + 4-AP**



**Figura 21.** Micrografías representativas de la neurodegeneración en el hipocampo, 24 horas después del experimento. Es evidente el daño celular inducido por 4-AP (7 mM). La perfusión del medio Krebs Ringer no genera daño celular. La sola administración del DHPG (1 mM) y el AIDA (1 mM) tampoco causan neurodegeneración en ninguna región del hipocampo. La perfusión del DHPG en presencia de la 4-AP genera muerte celular en las regiones CA1 y CA3 con un patrón similar al de la 4-AP sola. El efecto de la 4-AP no fue claramente reducido por la administración de AIDA. Barras=600  $\mu$ m y 60  $\mu$ m (cercano al tracto de la cánula)



**Figura 22.** Número de células sanas en la región CA1 del hipocampo a las 24 horas después del experimento. Nótese la importante neurodegeneración inducida por 4-AP (7 mM). La administración del agonista DHPG (1mM) o del antagonista AIDA (1mM) no causa daño celular. La perfusión de DHPG en presencia de 4-AP incrementa el número de células sanas. Al perfundir AIDA más 4-AP se observa un mayor número de células en la región CA1 del hipocampo.

#  $p < 0.0001$  significativo de Krebs vs 4-AP  
\*  $p < 0.001$  significativo 4-AP vs DHPG +4-AP  
\*  $p < 0.001$  significativo 4-AP vs AIDA +4-AP



## **7. Discusión**

En el presente trabajo se encontró que la activación selectiva de los mGluR I con el agonista DHPG no promueve actividad epileptiforme, no incrementa la liberación de glutamato y no altera la conducta de los animales. Al ser administrado en presencia de 4-AP los resultados señalan una combinación de las propiedades descritas de ambos fármacos al exacerbarse la actividad epileptiforme y extenderse el tiempo en estado epiléptico, sin que la neurodegeneración se exacerbe ni se incremente la liberación de glutamato.

Al bloquear los mGluR I con el antagonista AIDA tampoco se observan alteraciones en ningún parámetro evaluado. Al coadministrarse con la 4-AP se encontró que la neurodegeneración y las crisis epileptiformes son similares a lo observado con 4-AP sola, aunque se reduce discretamente la concentración extracelular de glutamato y el tiempo en estado epiléptico.

En los siguientes párrafos se discute sobre cada uno de nuestros resultados.

La 4-AP es un fármaco capaz de provocar un exceso en la liberación de neurotransmisores excitadores, inducir crisis epileptiformes y neurodegeneración tanto en ratas anestesiadas (Peña y Tapia, 1999) como en libre movimiento (Vera, 2004). La dosis empleada con esta última técnica fue seleccionada de acuerdo a la potencia observada de los efectos que tiene la droga en animales despiertos, con esta



concentración no se logró ver un incremento claro de la concentración extracelular de glutamato pero los efectos conductuales, en el EEG y la neurodegeneración son evidentes y similares a lo obtenido al administrar concentraciones iguales o mayores a 17.5 mM en ratas anestesiadas (Vera, 2004; Peña y Tapia, 1999).

Peña y Tapia (1999) describieron que el glutamato es determinante en la neurodegeneración provocada por la 4-AP, al existir una relación directa entre la concentración de glutamato extracelular y el daño celular observado, aunque la neurodegeneración también está determinada por las crisis epilépticas *per se* (Hass et al, 2001; Maru et al, 2002; Inoue et al, 1992). Por ello, existe correspondencia entre la liberación de glutamato, las crisis epileptiformes y la neurodegeneración observada a las 24 horas después de la aplicación de la 4-AP (Peña et al, 2002).

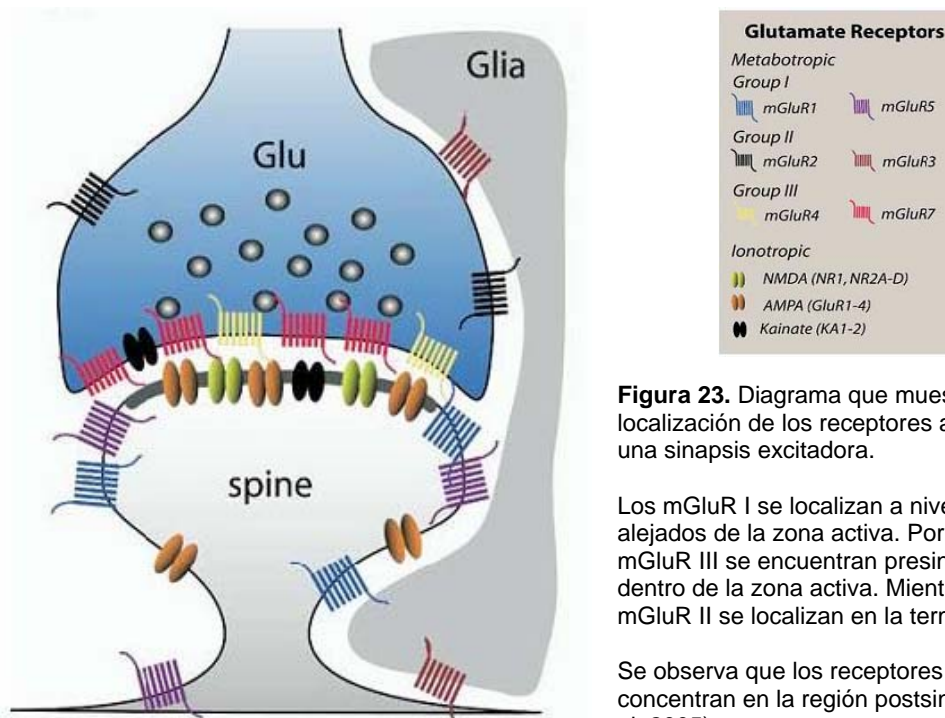
El exceso de transmisión glutamatérgica y la sobreactivación del receptor NMDA pueden inducir epilepsia y muerte neuronal por excitotoxicidad (Peña y Tapia, 1999).

Las investigaciones realizadas en el laboratorio han demostrado que la sobreactivación de los receptores NMDA por efecto del incremento en la liberación de glutamato inducido por 4-AP es responsable del daño celular y de las crisis epileptiformes. El efecto neurotóxico de la 4-AP es revertido por la administración de antagonistas del receptor NMDA. Tal es el caso del maleato de dozociclina (MK-801), que al ser



administrado i.p., ya sea antes o después de la perfusión de 4-AP, previene la epilepsia y reduce casi en su totalidad la neurodegeneración (Ayala y Tapia, 2003). Este mismo efecto se observó al administrar por microdiálisis el (+) 3-(2-carboxipiperazin-4il)-propil-1-fosfonato (CPP), otro antagonista del receptor NMDA. Mientras que al coadministrar 4-AP y 2,3-dihydro-6-nitro-7-sulfamoil-benzo(f)quinovalina (NBQX), un antagonista de receptores no-NMDA, no se observa la misma protección (Ayala y Tapia, 2005). Con estos trabajos realizados tanto en ratas anestesiadas como en libre movimiento (Vera, *manuscrito en preparación*) se propone que el daño celular por exceso en la liberación de glutamato está mediado principalmente por este tipo de receptores. Sin embargo, actualmente se sabe que el daño en el Sistema Nervioso Central es mediado tanto por los receptores ionotrópicos como por los metabotrópicos a glutamato (Forder y Tymianski, 2009; Lea y Faden, 2003).

Los receptores metabotrópicos a glutamato, como se muestra en la Figura 22, se localizan pre y postsinápticamente (Shigemoto et al, 1997; Lujan et al, 2005), juegan un papel muy importante en la liberación de neurotransmisores (Cartmel y Schoepp, 2000) y en las respuestas dadas por los receptores ionotrópicos (Blaabjerg et al, 2003).



**Figura 23.** Diagrama que muestra la localización de los receptores a glutamato en una sinapsis excitadora.

Los mGluR I se localizan a nivel postsináptico alejados de la zona activa. Por el contrario los mGluR III se encuentran presinápticamente dentro de la zona activa. Mientras que los mGluR II se localizan en la terminal axónica.

Se observa que los receptores ionotrópicos se concentran en la región postsináptica (Lujan et al, 2005).

La mayoría de las investigaciones señalan que los grupos II y III se localizan en las terminales presinápticas y al ser activados reducen la liberación de glutamato (Ure et al, 2006). Mientras que el grupo I aumenta la excitabilidad neuronal, tiene efectos proconvulsivantes y facilita la inducción de la potenciación a largo plazo (Ure et al, 2006).

### Activación de los mGluR I

La activación de los mGluR I estimula la PLC que resulta en la hidrólisis de fosfoinosítidos, la liberación de  $Ca^{2+}$  de estructuras intracelulares y la activación de la PKC (Schoepp et al, 1994). En este grupo se incluyen los subtipos mGluR1 y mGluR5. Según estudios de inmunoreactividad se encuentran abundantemente en el hipocampo de ratas adultas tanto



en neuronas como en glía (Schoepp et al, 1994). Se localizan en la postsinápsis (Cartmell y Schoepp, 2000) específicamente en regiones aledañas o región perisináptica (Shigemoto et al, 1997; Shigemoto y Mizuno, 2000). En general, se ha descrito que su activación facilita la liberación de glutamato de terminales nerviosas (Musante et al, 2008), genera daño celular en la región CA1 del hipocampo de ratas en libre movimiento (Camón et al, 1998) y regula la actividad epileptiforme tanto en modelos *in vitro* (Karr y Rutecki, 2008; Stoop et al, 2003; Thuault et al, 2002) como *in vivo* (Camón et al, 1998; Tizzano et al, 1995). Sin embargo, los resultados obtenidos al activar estos receptores han sido variables, ya que también se ha descrito protección contra daño excitotóxico con NMDA (Baskys et al, 2005; Blaabjerg et al, 2002) o por privación de oxígeno-glucosa (Scartabelli et al, 2008) al administrar el agonista DHPG en estudios *in vitro*.

En el presente trabajo encontramos que la administración del DHPG (1 mM) no promovió actividad epileptiforme. En la Figura 11 se puede apreciar que no existe incremento en la frecuencia y tampoco se perciben cambios en la amplitud de la señal eléctrica.

Nuestros resultados difieren con la mayoría de las investigaciones realizadas *in vitro*, en las cuales se ha encontrado que este compuesto a una concentración de 25  $\mu$ M causa un severo incremento en la frecuencia de disparo que se acompaña del decremento en la duración y en la amplitud de la señal eléctrica, patrón que se traduce como



crisis epileptiformes en registros de rebanadas de hipocampo de rata (Karr y Rutecki, 2008; Thuault et al, 2002). Los cambios ocasionados por el DHPG en la excitabilidad neuronal se mantienen incluso en su ausencia (Karr y Rutecki, 2008), por lo que se ha propuesto que induce alteraciones a largo plazo en la eficiencia sináptica (Piccinin et al, 2008). La diferencia entre estos trabajos realizados *in vitro* y lo encontrado por nosotros *in vivo*, puede deberse a la falta de correspondencia entre un modelo y otro.

A diferencia de lo encontrado por Camón et al, (1998) quienes inyectaron DHPG (1.5  $\mu\text{mol}$ ) en el ventrículo lateral izquierdo, en un modelo de libre movimiento, encontrando que este agonista induce crisis convulsivas que van de mediana intensidad seguidas de convulsiones severas hasta el establecimiento del estado epiléptico, además de importante daño en CA1 que se extiende en menor proporción sobre CA3, sin que exista relación entre la intensidad de las crisis y el daño celular observado. En nuestro modelo el DHPG no alteró la conducta de los animales, no ocasionó daño celular en ninguna región del hipocampo y tampoco modificó la concentración extracelular de glutamato. La diferencia entre lo descrito en el trabajo realizado por Camón et al, (1998) y nuestros resultados puede deberse a la forma de administración del fármaco, así como, el área de aplicación.





Existe evidencia de que la actividad epileptiforme mediada por el DHPG es no sináptica (Piccinin et al, 2008; Thuault et al, 2002). Por otra parte, los efectos que desencadena la 4-AP son de carácter sináptico al incrementar la liberación de neurotransmisores (Peña y Tapia, 2000). Cuando administramos el DHPG más 4-AP se obtuvo un incremento significativo de la actividad epileptiforme mayor al que produce la 4-AP *per se* (Fig 22), notorio tanto en la amplitud como en la frecuencia, aunque estadísticamente sólo en esta última existen diferencias significativas ( $p < 0.01$ ). Conductualmente las crisis epileptiformes presentadas por este grupo se exacerbaron y su recuperación fue más lenta. Lo anterior sugiere que se pudieron combinar las propiedades descritas de ambos fármacos. Sin embargo, la concentración extracelular de glutamato no aumentó y tampoco se produjo mayor muerte celular, respecto al grupo tratado con 4-AP sola. Por lo que los resultados respecto al papel que desempeñan los mGluR I siguen siendo ambiguos.

Algunas explicaciones por las que se presume inducción de daño al estimular la actividad de los mGluR I, son la potenciación de las respuestas del receptor NMDA por variaciones en sus subunidades (Allen et al., 2001; Nicoletti et al., 1999) y la movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular (Tizzano et al., 1995).

Contrariamente a lo anterior, existen datos que indican efecto neuroprotector por activación de los mGluR I, pudiendo desempeñar



un papel de autoreceptores y así regular la transmisión sináptica (White et al., 2003). También se ha vinculado el efecto del DHPG con la vía de señalización de PI<sub>3</sub>K-AKT y con ello la reducción de muerte apoptótica (Scartabelli et al., 2008). Se ha descrito que también reduce las corrientes postsinápticas excitadoras del receptor AMPA y que incluso facilita la neurogénesis (Baskys et al., 2005).

Debido a las contradicciones encontradas al activar los mGluR I, se ha propuesto que las diferencias en su actividad dependen del modelo empleado (Thuault et al., 2002), del tiempo de administración de los fármacos (Baskys et al., 2005), de la dosis empleada y la vía de administración, e incluso se propone la desensibilización del receptor (Blaabjerg et al., 2003).

A diferencia de nuestros resultados, la activación selectiva de los mGluR III reduce notablemente la concentración extracelular de glutamato, previene la neurodegeneración y protege contra el efecto epileptogénico inducido por la 4-AP (Vera, *manuscrito en preparación*). La diferencia entre los resultados observados al activar los mGluR III y los mGluR I puede estar determinada por su localización. Ya que, como se mencionó antes, los mGluR III sí se localizan en las terminales sinápticas y su activación regula la liberación de glutamato al actuar como autoreceptores (Shigemoto y Mizuno, 2000; Pin y Duvoisin, 1995). Mientras que, los mGluR I se localizan en la región postsináptica, alejados de las zonas activas y su activación tiene



efectos postsinápticos que contribuyen a la vulnerabilidad celular en el daño excitotóxico (Pin y Duvoisin, 1995).

### Bloqueo de los mGluRI

El AIDA ha sido descrito por Moroni et al. (1997), como un antagonista selectivo de los mGluR I aunque con actividad preferente en los mGluR1 ( $IC_{50}=251 \mu M$ ) sobre los mGluR5 ( $IC_{50}>1mM$ ), sin que a una concentración menor o igual a  $300 \mu M$  afecte la actividad de la adenilato ciclasa. Este compuesto reduce con una  $IC_{50}=214 \mu M$  la hidrólisis de fosfoinosítidos asociada a la PLC e inducida por L-glutamato  $10 \mu M$ , sin tener efecto en los mGluRs acoplados a la fosfolipasa D (PLD) (Moroni et al, 1997). Su administración i.c.v. incrementa el umbral al dolor (Moroni et al, 1997), causa ataxia, tremor y deficiencia motora (Aiba et al, 1994; Moroni et al, 1997).

Con la finalidad de conocer el efecto del bloqueo de los mGluR I, administramos el AIDA (1 mM). De acuerdo con nuestros resultados no ocasionó cambios en la concentración extracelular de glutamato. Estos datos coinciden con la investigación realizada por Cozzi et al. (2002), quienes administrando el AIDA (1 mM) por microdiálisis en libre movimiento en el hipocampo dorsal de gerbos, también encontraron que la liberación basal de glutamato se mantiene inalterada y constante hasta por cuatro horas.



En otro trabajo realizado por Stoop et al. (2003) observaron que la administración de AIDA (50  $\mu$ M) en rebanadas de hipocampo de ratón no altera la frecuencia de disparo neuronal. De igual manera nuestro tratamiento con AIDA (1 mM), no ocasionó cambios en la actividad EEG. La conducta observada es similar a la del grupo tratado con solución Ringer y no se advierte neurodegeneración en el área perfundida por lo que su administración no es tóxica.

Lo que encontramos al administrar AIDA más 4-AP es un decremento progresivo del glutamato, que en la última fracción llega a ser la mitad del promedio de su concentración basal. De acuerdo con nuestro análisis estadístico, éste decremento es significativamente diferente al promedio basal; sin embargo, es posible que ésta reducción no sea relevante a nivel fisiológico. Aunque no descartamos que dicho decremento esté relacionado con el mayor número de células sanas presentado por este grupo comparado con el tratamiento de 4-AP sola. En general, la amplitud y la frecuencia de las espigas epileptiformes se presentaron similares, respecto a lo observado con 4-AP. Sin embargo, conductualmente, las crisis epileptiformes se presentaron menos intensas y su recuperación fue más rápida.

Nuestros resultados anteriores, concuerdan con lo encontrado por Cozzi et al. (2002), quienes administraron intrahipocampalmente AIDA (1 mM), empleando la técnica de microdiálisis, y describieron una



protección parcial contra la neurodegeneración después de daño isquémico. Sin embargo, observaron que al aumentar la dosis a una concentración de 3 mM la protección aumentó 4 veces. En esta investigación también se demostró reducción de la actividad epileptiforme al administrar antagonistas específicos para cada uno de los subtipos de mGluR I. Los resultados indican que solamente el antagonista del mGluR1 protege mientras que el antagonista del mGluR 5 permanece inactivo (Cozzi et al., 2002). Lo cual concuerda con lo encontrado por Meli et al. (2002), quienes demostraron que la administración i.c.v de AIDA (300 nmol), protege contra la neurodegeneración inducida por daño isquémico, mientras que el antagonista específico de los mGluR5 (MPEP) no tiene efecto. Sin embargo, se cree más probable el funcionamiento coordinado de ambos subtipos de receptores (Stoop et al., 2003; Thuault et al., 2002).

Algunas investigaciones han demostrado que los mGluR I están localizados en interneuronas GABAérgicas de la sustancia negra (Hubert et al., 2001). Proponiendo que controlan negativamente la liberación de GABA. Por ello al ser bloqueados permiten el incremento en la liberación de este neurotransmisor, siendo el mecanismo mediante el cual se observa protección (Cozzi et al., 2002; Meli et al., 2002). Aunque hasta ahora este mecanismo no ha sido comprobado en hipocampo.



Con respecto a los aminoácidos no excitadores, tal como se mencionó en la metodología, también fueron analizados con la finalidad de tener indicadores sobre la adecuada realización de nuestros experimentos. Mencionaremos que ninguno de ellos, a excepción de la taurina, presentó variaciones estadísticamente significativas. Debido a que en la mayoría de nuestros resultados, la taurina presentó estas variaciones, comentaremos brevemente su función fisiológica. Sin embargo, de acuerdo con nuestro objetivo, los cambios en la concentración extracelular de glutamina, glicina, taurina y alanina, no representan el eje central temático del presente trabajo y su discusión es prescindible.

De acuerdo con lo descrito en la literatura, la taurina actúa como un osmolito celular (Pasantes-Morales et al., 1998). Es liberado tanto, por astrocitos como por neuronas, en respuesta a la regulación del volumen celular, ante un desequilibrio en la presión osmótica, incrementándose con ello, su concentración en el medio extracelular (Tuz et al., 2004; Pasantes-Morales et al., 1998). Con lo anterior, podemos decir que las variaciones en la concentración extracelular de taurina, observadas en nuestros experimentos, son producto de la respuesta celular ante estímulos externos, tales como la introducción de la cánula de microdiálisis y la perfusión de las diferentes drogas en un medio semejante, en composición química, al líquido cefalorraquídeo.



## **8. Conclusiones**

En este trabajo al combinar la técnica de microdiálisis con el registro EEG y el análisis histológico, se estudió la participación de los receptores metabotrópicos a glutamato del grupo I en el proceso neurodegenerativo y epiléptico producido por la 4-AP. Relacionando el exceso de transmisión glutamatérgica con la generación de actividad epileptiforme, presencia de crisis convulsivas y muerte neuronal en el hipocampo de rata.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. La administración intrahipocampal de 4-aminopiridina continúa siendo una excelente herramienta experimental para aumentar la transmisión glutamatérgica, promover actividad epileptiforme, crisis convulsivas y muerte neuronal.
2. El agonista DHPG y el antagonista AIDA por sí mismos en las condiciones y concentraciones empleadas, no produjeron daño celular, variación en la concentración de aminoácidos, modificación de la actividad EEG y tampoco alteraron la conducta normal de los animales, con lo que se demuestra que ninguno ejerce efectos neurotóxicos.



3. El agonista DHPG funcionó como un potenciador de la actividad epileptiforme y de las crisis convulsivas, en presencia de la 4-AP. Sin embargo, no exacerbó la muerte neuronal, en comparación con la administración de 4-AP sola. Se concluye que no hay correspondencia entre la generación de crisis epileptiformes y el daño celular observado.

La activación de estos receptores en las condiciones experimentales empleadas, a diferencia de los mGluR III, no disminuyen la liberación de glutamato.

4. El antagonista AIDA en presencia de la 4-AP, tuvo un efecto protector al reducir discretamente la neurodegeneración de la región CA1 del hipocampo, disminuir la concentración extracelular de glutamato y acortar el tiempo de recuperación de las crisis epileptiformes. Es probable que empleando una dosis mayor de AIDA se puedan evitar las crisis epileptiformes y proteger mejor contra la neurodegeneración, perfilándose así, como un buen fármaco neuroprotector. Queda para futuras investigaciones confirmar ésta hipótesis.





## 9. Bibliografía.

- Aiba A, Kano M, Chen C, Stanton ME (1994). *Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice.* Cell 79: 377-388.
- Allen JW, Eldadah BA, Faden AI (1999).  $\beta$ -amyloid-induced apoptosis of cerebellar granule cells and cortical neurons: exacerbation by selective inhibition of group I metabotropic glutamate receptors. Neuropharmacology. 38: 1243-1252.
- Allen JW, Vicini S, Fden AI (2001). *Exacerbation of neuronal cell death by activation of group I metabotropic glutamate receptors: role of NMDA receptors and arachidonic acid release.* Exp Neurol. 169: 449-460.
- Arias C (1991). *Padecimientos degenerativos crónicos del SNC. Hipótesis excitotóxica.* Ciencia 42:69-80.
- Ayala GX, Tapia R (2003). *Expression of heat shock protein 70 induced by 4-aminopyridine through glutamate-mediated excitotoxic stress in rat hippocampus in vivo.* Neuropharmacology. 45:649-660.
- Ayala GX, Tapia R (2005). *Late N-methyl-D-aspartate receptor blockade rescues hippocampal neurons from excitotoxic stress and death after 4-aminopyridine-induced epilepsy.* Eur. J. Neurosci. 22:3067-3076.
- Ayala GX, Tapia R (2008). *HSP70 expression protects against hippocampal neurodegeneration induced by endogenous glutamate in vivo.* Neuropharmacology. 55: 1383-1390.
- Baskys A, Bayazitov I, Fang L, Blaabjerg M (2005). *Group I metabotropic glutamate receptors reduce excitotoxic injury and may facilitate neurogenesis.* Neuropharmacology 49: 146-156.
- Bittigau P, Ikonomidou C. (1997). *Glutamate in neurological diseases.* J. Child Neurol. 12:471-485.
- Blaabjerg M, Fang L, Zimmer J, Baskys A (2003). *Neuroprotection against NMDA excitotoxicity by group I metabotropic glutamate receptors is associated with reduction of NMDA stimulated currents.* Exp. Neurol. 183:573-580.
- Brailowsky, S (1999). *Epilepsia. Enfermedad sagrada del cerebro.* México: Fondo de Cultura Económica, la ciencia para todos. Cap II y IV.



- Broman J, Hassel E, Rinvik E (2000). *Biochemistry and anatomy of transmitter glutamate*. En Danbolt NC (2000). *Handbook of chemical neuroanatomy*. Elsevier Vol 18. Glutamate Cap. 1
- Buckle PJ and Haas HL. (1982). *Enhancement of synaptic transmission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the rat*. J.Physiol. 326 pp. 109-122.
- Camón L, Vives P, de Vera N (1998). *Seizures and neuronal damage induced in the rat by activation of group I metabotropic glutamate receptors with their selective agonist 3,5-Dihydroxyphenylglycine*. J. Neurosci Res. 51:339-348.
- Carlson H, Ronne-Engstrom E, Ungerstedt U (1992). *Seizure related elevations of extracellular amino acids in human focal epilepsy*. Neurosci Lett. 140:30-32.
- Cartmell J, Schoepp DD (2000). *Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors*. J. Neurochem. 75: 889-907.
- Chapman AG, Yip PK, Yap JS. (1999). *Anticonvulsant actions of LY367385 ((+)-2-methyl-4-carboxyphenylglycine) and AIDA ((RS)-1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid*. Eur. J. Pharmacol. 368:17-24.
- Choi DW (1988). *Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system*. Neuron. 1: 623-634.
- Cozzi A, Meli E, Carlà V, Pellicari R (2002). *Metabotropic glutamate 1 (mGlu1) receptor antagonists enhance GABAergic neurotransmission: a mechanism for the attenuation of post-ischemic injury and epileptiform activity?* Neuropharmacology. 43: 119-130
- Danbolt NC (2000). *Handbook of chemical neuroanatomy*. Elsevier Vol 18. Glutamate Cap. 8
- Davenport HW (1991). *Early history of the concept chemical transmission of the nerve impulse*. Physiologist. 34:178-188.
- Dingledine R y McBain C. (1994). *Excitatory amino acid transmitters*. En, Siegel GJ, Agranoff BE, Albers RW (1994). *Basic Neurochemistry*. Raven Press. Cap.17
- Erulkar SD. (1994). *Chemically mediated synaptic transmission: an overview*. En, Siegel GJ, Agranoff BE, Albers RW (1994). *Basic Neurochemistry*. Raven Press. Cap.9



- Faden AI, Simon RP (1998). *A potencial role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury*. Ann Neurol. 23: 623-636.
- Feria A, Castillo S, Ortiz G., (1997). *Cambios neuromorfológicos asociados a las convulsiones*. En, Feria A, Martínez de Muñoz D, Rubio F (1997). *Epilepsia, aspectos neurobiológicos, médicos y sociales*. Ediciones del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Departamento de Publicaciones Científicas. Cap 2.
- Feria A, Martínez de Muñoz D, Rubio F (1997). *Epilepsia, aspectos neurobiológicos, médicos y sociales*. Ediciones del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Departamento de Publicaciones Científicas. 426
- Forder JP, Tymianski M (2009). *Postsynaptic mechanisms of excitotoxicity: involvement of postsynaptic density proteins, radicals and oxidant molecules*. Neuroscience.158: 293-300.
- Greenamyre JT (1986) *The role of glutamate in neurotransmission and in neurologic disease*. Arch.Neurol. 43: 1058-1063.
- Hass KZ, Sperber EF, Opanashuk LA, Stanton PK (2001). *Resistance of immature hippocampus to morphologic and psysiological alterations following status epilepticus or kindling*. Hippocampus. 6: 615-625.
- Hazle B y Dingleline R (2006). *Glutamate*. En En Siegel GJ, Alberts RW, Brady ST (2006). *Basic neurochemistry*. Elsevier Academic Press. Cap 11.
- Hernández de CJ (2004). *Aspectos psicosociales de la epilepsia*. En Medina M (2004). *Epilepsia, aspectos clínicos y psicosociales*. Colombia: Editorial medica panamericana. Cap 11.
- Holz RW y Fisher SK (2006). *Synaptic transmisión and cellular signaling: an overview*. En Siegel GJ, Alberts RW, Brady ST (2006). *Basic neurochemistry*. Elsevier academic press. Cap 10.
- Hubert GW, Paquet M, Smith Y (2001). *Differential subcellular localization of mGluR1a and mGluR5 in the rat and monkey substatia nigra*. J. Neurosci. 21: 1838-1847.
- Inoue K, Morimoto K, Sato K, Yamada N (1992). *Mechanisms in the development of limbic and hippocampal neuron loss: an experimental study in a model of status epilepticus induced by kindling-like electrical stimulation of the deep prepyriform cortex in rats*. Acta Med. Okayama. 46: 129-139.



- Kaku DA, Giffard RG, Choi DW (1993). *Neuroprotective effects of glutamate antagonist and extracellular acidity*. Science. 260: 1516-1518.
- Kandel ER (1998). *A new intellectual framework for psychiatry*. Am. J. Psychiatry. 140: 1277-1293.
- Kandel ER (1999). *Biology and the future of psicoanálisis: a new intellectual framework for psychiatry revisited*. Am. J. Psychiatry. 156: 505-524.
- Kandel ER, Schwartz, JH, Jessell, TM (2001). *Principles of neural science*. España: McGraw-Hill. 4ª edición Cap 15, 46 y 62.
- Karr L, Rutecki P. (2008). *Activity-dependent induction and maintenance of epileptiform activity produced by group I of metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampal slice*. Epilepsy Res. 81 (1): 14-23.
- Kato K, Urino T, Hori T (2008). *Experimental petit mal-like seizure induced by microinjection of kainic acid into the unilateral mediodorsal nucleus of the thalamus*. Neurol. Med. Chir (Tokyo). 48 (7): 285-91.
- Kew JN, Kemp JA (2005). *Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology*. Psychopharmacology. 179: 4-29.
- Lea PM, Faden AI (2003). *Modulation of metabotropic glutamate receptors as potential treatment for acute and chronic neurodegenerative disorders*. Drug News Perspect. 16 (8): 513-522.
- Lechtenberg R (1989). *La epilepsia y la familia*. España: Editorial Herder. Cap 1.
- Luján R, Shigemoto R, López-Bendito (2005). *Glutamate and GABA receptors signalling in the developing brain*. Neuroscience. 130: 567-580.
- Luria AR, (1974) *El cerebro en acción*. Moscú: Ediciones Roca, libros universitarios y profesionales. Cap. 1
- Lyeth BG, Gong QZ, Shields S (2001). *Group I metabotropic glutamate receptor antagonist reduces acute neuronal degeneration and behavioral deficits after traumatic brain injury in rats*. Exp. Neurol. 169: 191-199.
- Maiken N, Takahiro T, Anker JH (2002). *Beyond the role of glutamate as neurotransmitter*. Nature. Vol 3. pp.748-755.



- Maru E, Kanda M, Ashida H (2002). *Functional and morphological changes in the hippocampal neuronal circuits associated with epileptic seizures*. *Epilepsia*. 43: 44-49.
- Massieu, L., Tapia, R., 1997. *Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo*. *J. Neurochem.* 69: 1151-1160.
- Massieu, L., Morales-Villagran, A., Tapia, R., 1995. *Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study*. *J. Neurochem.* 64: 2262-2272.
- Medina-Ceja L, Cordero-Romero A, Morales-Villagrán A (2008). *Antiepileptic effect of carbonoxolone on seizures induced by 4-aminopyridine : A study in the rat hippocampus and entorhinal cortex*. *Brain Res.* 1187: 74-81.
- Meli E, Picca R, Attucci S, Cozzi A (2002). *Activation of mGlu 1 but not mGlu 5 metabotropic glutamate receptors contributes to postischemic neuronal injury in vitro and in vivo*. *Pharmacol. Biochem.Behav.* 73: 439-446.
- Michaelis MK (1997). *Molecular Biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging*. *Prog. Neurobiol.* 54:369-415.
- Morales-Villagran, A., Tapia, R., 1996. *Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo*. *Neurochem. Int.* 28: 35-40.
- Moroni F, Lombardi G, Thomsen C (1997). *Pharmacological characterization of 1-Aminoindan-1,5-dicarboxylic acid, a potent mGluR1 antagonist*. *J. Pharmacol Exp Ther.* 281: 721-729.
- Musante V, Neri E, Feligioni M.(2008). *Presynaptic mGlu1 and mGlu5 autoreceptors facilitate glutamate exocytosis from mouse cortical nerve endings*. *Neuropharmacology.* 55: 474-482.
- Nakanishi S. (1992). *Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function*. *Science.* 258: 597-603.
- Nicoletti F, Bruno V, Catania MV, Battaglia G (1999). *Group-I metabotropic glutamate receptors: hypothesis to explain their dual role in neurotoxicity and neuroprotection*. *Neuropharmacology.* 38: 1477-1484.



- Olney JW, Ho OL, Rhee V. (1971) *Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids in the infant mouse central nervous system*. Exp. Brain Res. 14: 61-70
- Olney JW (1978). *Neurotoxicity of excitatory amino acids*. In: *Kainic acid as tool in neurobiology* (McGreer EG, Olney JW, McGreer PL, eds) New York: Raven Press. pp 95-121.
- Olney JW (2003). *Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders*. Curr. Opin. Pharmacol. 3 (1): 101-109.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998). *Glutamate receptors in the mammalian central nervous system*. Prog Neurobiol. 54: 581-618.
- Pasantes H, Sánchez J, Tapia R (1991). *Neurobiología celular*. México: Fondo de Cultura Económica.
- Pasantes-Morales H, Quesada O, Morán H (1999). *Taurine: an osmolyte in mammalian tissues*. Adv. Exp. Med. Biol. 442: 209:217.
- Paxinos G, Watson C. (1982). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press.
- Pellegrini-Giampetro de, Peruginelli F, Meli E. (1999). *Protection with metabotropic glutamate1 receptor antagonist in models of ischemic neuronal death: time-course and mechanisms*. Neuropharmacology. 38: 1607-1619.
- Peña F, Tapia R (1999). *Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study*. J. Neurochem. 72: 2006-2014.
- Peña F, Tapia R (2000). *Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: Role of glutamate-and GABA- mediated neurotransmission and of ion channels*. Neuroscience. 101: 547-561.
- Peña F (2001). *Papel del glutamato en la epilepsia y la neurodegeneración producidas por la 4-aminopiridina en el hipocampo in vivo*. Tesis de doctorado, UNAM.
- Petrovic M, Horak M, Sedlace KM (2005). *Physiology an pharmacology of NMDA receptors*. Prague Med. Rep. 106(2):113-36.



- Piccinin S, Thuault SJ, Doherty AJ (2008). *The induction of long-term plasticity of non-synaptic, synchronized activity by the activation of group I mGluRs*. *Neuropharmacology*. 55: 459-463.
- Pin J P and Duvoisin R (1995). *The metabotropic glutamate receptors: structure and functions*. *Neuropharmacology*. 34: 1-26.
- Racine RJ (1972). *Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure*. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32 (3): 281-294.
- Ramírez- Munguia N, Vera G, Tapia R (2003). *Epilepsy, neurodegeneration and extracellular glutamate in the hippocampus of awake and anesthetized rats treated with okadaic acid*. *Neurochem Res*. 28:1517-1524.
- Robinson M, Hunter-Ensor M, Sinor J (1991). *Pharmacologically distinct sodium-dependent L-(3H) glutamate transport processes in rat brain*. *Brain Res*. 544: 196-202.
- Robinson TE, Justice JB. (1991). *Microdialysis in the neurosciences*. ELSEVIER, Vol 7. Techniques in the behavioral and neural sciences.
- Rocha L. (1997). *Microdiálisis*. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Cap 1.
- Rothman S (1985). *The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx*. *J. Neurosci*. 5: 1483-1489.
- Rubio, F. (1997). *Aspectos generales y clasificación de la epilepsia*. En, Feria A, Martínez de Muñoz D, Rubio F (1997). *Epilepsia, aspectos neurobiológicos, médicos y sociales*. Ediciones del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Departamento de Publicaciones Científicas. Cap 1.
- Salazar P, Montiel T, Brailowsky S, Tapia R (1994). *Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of  $\gamma$ -aminobutyric acid*. *Neurochem. Int*. 24: 363-368.
- Scartabelli T, Gerace E, Landucci E, Moroni F (2008). *Neuroprotection by group I mGlu receptors in rat hippocampal slice model of cerebellar ischemia is associated with PI3K-AKT signaling pathway: a novel postconditioning strategy?* *Neuropharmacology*. 55: 509-516.



- Schoepp DD., Goldsworthy J, Johnson B.G. (1994). *3,5-Dihydroxyphenylglycine is a highly selective agonist for phosphoinositide-linked metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus*. J. Neurochem. 63: 769-772.
- Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, et al. (1997) *Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus*. J. Neurosci. 17: 7503-7522.
- Shigemoto R and Mizuno N. (2000). *Handbook of chemical neuroanatomy*. Elsevier Vol 18. Glutamate Cap. 3
- Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K (2004). *Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAAT's and VGLUT's*. Brain Res Rev. 45 (3): 250-265.
- Strasser U, Lobner D, Behrens M (1998). *Antagonists for group I mGluRs attenuate excitotoxic neuronal death in cortical cultures*. Eur. J. Neurosci. 10: 2848-2855.
- Stoop R, Conquet F, Pralong E. (2003). *Determination of group I metabotropic glutamate receptor subtypes involved in the frequency of epileptiform activity in vitro using mGluR1 and mGluR5 mutant mice*. Neuropharmacology. 44:157-162.
- Tapia R (1998). *Mecanismos celulares y moleculares de la neurodegeneración*. Gaceta Medica. 134: 685-703.
- Tapia R, Medina-Ceja L, Peña F (1999). *On the relationship between extracellular glutamate, hiperexcitation and neurodegeneration, in vivo*. Neurochem. Int. 34: 23-31.
- Tapia R, Massieu L. (1997). *Neuroquímica de los procesos epilepticos: sinapsis inhibitorias y excitadoras*. En, Feria A, Martínez de Muñoz D, Rubio F (1997). *Epilepsia, aspectos neurobiológicos, médicos y sociales*. Ediciones del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Departamento de Publicaciones Científicas. Cap 5.
- Tapia R, Sitges M. (1982). *Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes*. Brain Res. 250:291-299.
- Thauault SJ, Davies CH, Randall AD. (2002). *Group I mGluRs modulate the pattern of non-synaptic epileptiform activity in the hippocampus*. Neuropharmacology. 43:141-146.
- Tizzano JP, Griffey KI, Schoepp DD. (1995). *Induction or protection of limbic seizures in mice by mGluR subtype selective agonists*. Neuropharmacology. 34 (8): 1063-1037.





- Toscazo CD, Kingsley PJ, Marnett LJ (2008). *NMDA-induced seizure intensity is enhanced in cox.2 deficient mice*. *Neurotoxicology*. 29 (9): 1114-20.
- Tuz K, Peña-Segura C, Franco R (2004). *Depolarization exocytosis and amino acid release evoked by hyposmolarity from cortical synaptosomes*. *Eur. J. Neurosci*. 19:916-924.
- Ure J, Michel B, Perassolo M (2006). *Metabotropic glutamate receptors and epilepsy*. *J. Neurol. Sci*. 247: 1-9.
- Vera G (2004). *Protección paradójica de la excitotoxicidad glutamatérgica por acumulación de glutamato extracelular en el hipocampo de la rata, in vivo*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Versteeg D, Heemskerk F, Spierenburg H. (1995). *4-Aminopyridine differentially affects the spontaneous release of radiolabelled transmitters from rat brain slices in vitro*. *Brai Res*. 686:233.238.
- Vucević D, Hrncić D, Radosavljević T, Mladenović D (2008). *Correlation between electrocorticographic and motor phenomena in lindane-induced experimental epilepsy in rats*. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 86 (4): 173-179.
- White A, Kylanpaa RA, Christie L (2003). *Presynaptic group I metabotropic glutamate receptors modulate synaptic transmission in the rat superior colliculus via 4-AP sensitive K<sup>+</sup> channels*. *Br. J. Pharmacol*. 140:1421-1433.
- Widsen W, Seeburg PH, Monyer H. (2000). *AMPA, kainate and NMDA ionotropic glutamate receptor expression-an in situ hybridization atlas*. En Danbolt NC (2000). *Handbook of chemical neuroanatomy*. Elsevier Vol 18. Glutamate Cap. 4
- Yi JH, Hazell AS (2006). *Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury*. *Neurochem. Res*. 48 (5): 394-403.
- Zeng X, Zhang Y (2007). *A microdialysis study of effects of gastrodin on neurochemical changes in the ischemic/reperfused rat cerebral hippocampus*. *Biol.Pharm. Bull*. 30 (4): 801-804
- Zinser O (1987). *Psicología experimental*. México: McGraw-Hill Latinoamericana.



## **ANEXO 1.** Escala descriptiva de ocurrencia de conducta convulsiva

Se presenta a continuación la escala descriptiva, modificada de Racine (1972) y Vučević (2008), con la cual se calificó la conducta convulsiva de los tratamientos con 4-aminopiridina (4-AP), de acuerdo a su incidencia e intensidad. La escala está dividida en cinco estados progresivos y la calificación se asignó si se presentaba al menos uno de los signos mencionados.

1=inmovilidad.

2=postura rígida, movimientos oscilatorios de la cabeza y movimientos masticatorios

3=estereotipias (ej. acicalamiento constante y sacudidas de rata mojada) y mioclonias bilaterales de las extremidades anteriores,

4=sobresaltos, progresión a la convulsión clónica generalizada seguida de la extensión tónica de las extremidades anteriores, posteriores y de la cola

5=*status epilepticus*

Estado 1	SÍ	NO
Estado 2	SÍ	NO
Estado 3	SÍ	NO
Estado 4	SÍ	NO
Estado 5	SÍ	NO