



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Revisión de la regulación del cloruro intra-neuronal
por la vía WNK-SPAK-NKCC1/KCC2 y sus
implicaciones en el desarrollo de la epilepsia**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A

MORALES ROJAS DIANA XARENIE

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA DE JESÚS CHÁVEZ CANALES

ASESORA DE TESIS: DRA. ROSA LINARES CULEBRO

ASESORA DE TESIS: DRA. ELIZABETH VIEYRA VALDEZ

Ciudad de México, 2022.



**FES
ZARAGOZA**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, por permitirme realizar el presente trabajo de tesis en sus instalaciones.

A la Dra. María de Jesús Chávez Canales, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y brindarme su paciencia, tiempo, confianza, dirección, enseñanza y apoyo incondicional en cada paso para realizar este proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en específico a la Facultad de estudios Superiores Zaragoza, por las oportunidades brindadas durante mi desarrollo profesional.

A las Dra. Rosa Linares Culebro y Dra. Elizabeth Vieyra Valdez por sus revisiones y su valiosa aportación a este trabajo.

A la Q.F.B. Norma Vázquez y a la Biól. Lorena López Griego por su gran apoyo técnico en el desarrollo de este proyecto.

Al personal adscrito al departamento de patología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, al Dr. Alberto Aranda Fraustro, Olga Pérez Reyes Y Benito Chávez Rentería.

A mis compañeros de laboratorio Samantha, Kevin, Kuahutemok y Luis por su apoyo incondicional y compañía.

Este trabajo fue posible gracias a los financiamientos obtenidos por parte de la DGAPA/PAPIIT (Proyecto IA203620) y por el Fondo Sectorial de CONACYT (Proyectos 87794 y 845144).

DEDICATORIAS

A mi amada madre

A mi hermano

A mis amigos de la FES Zaragoza

A mi querida Tuna, La Tuna Femenil de la FES Zaragoza, UNAM

A ti Israel

Por todo el apoyo que me han brindado en las diferentes etapas de mi desarrollo personal y profesional. ¡Gracias infinitas!

Índice

<i>Índice de Figuras</i>	<i>I</i>
<i>Índice de Tablas</i>	<i>I</i>
<i>Lista de abreviaturas</i>	<i>II</i>
1 Planteamiento del problema	1
2 Pregunta de investigación	1
3 Objetivo general	2
3.1 Objetivos particulares.....	2
4 Método	3
5 Introducción	5
6 Epilepsia	9
6.1 Epidemiología.....	10
6.2 Tipos de epilepsia	11
7 Neurobiología de la epilepsia	14
7.1 Función de GABA en neuronas inmaduras y maduras	18
8 Cotransportadores CCC	20
8.1 Regulación de la actividad del cotransportador Cation-Cloruro K^+-Cl^- Isoforma 2 (KCC2) en la epilepsia	23
8.2 Regulación de la actividad del cotransportador Cation-Cloruro $Na^+-K^+-2Cl^-$ Isoforma 1 (NKCC1) en la epilepsia	26
8.3 Regulación de la actividad y expresión de NKCC1 y KCC2 mediante su fosforilación por la vía WNK-SPAK/OSR1-CCC.....	29
9 Epileptogénesis	34
10 Modelos genéticos en animales y mutaciones humanas de NKCC1 y KCC2 asociadas con la epilepsia	35
10.1 Modelos genéticos, disfunción de KCC2 o NKCC1 en la epilepsia.	36
10.2 Mutaciones humanas	41
10.3 Modelos genéticos de no mamíferos.....	43
11 Tratamientos para la epilepsia	44
11.1 Tratamientos farmacológicos.....	46
11.2 Fármacos antiepilépticos	48
11.3 Tratamientos no farmacológicos	53

12	<i>Discusión y conclusiones</i>	56
	<i>Bibliografía</i>	60

Índice de Figuras

<i>Figura 1 Marco para la clasificación de la epilepsia. Modificada de Scheffer et al., 2017.</i>	13
<i>Figura 2 Síntesis del neurotransmisor GABA. Modificada de Jin et al., 2013.</i>	16
<i>Figura 3 Secuencia de desarrollo de acciones de GABA.</i>	20
<i>Figura 4 Árbol filogenético de los cotransportadores catión-cloruro.</i>	22
<i>Figura 5 Respuesta de la estimulación de GABA en neuronas mediada por la actividad de NKCC1 y KCC2.</i>	28
<i>Figura 6 Vía WNK-SPAK/OSR1-CCC.</i>	33
<i>Figura 7 Estructura y sitios de unión del GABAA R.</i>	47
<i>Figura 8 Modelo de la Vía WNK-SPAK/OSR1-CCC en la epilepsia.</i>	57

Índice de Tablas

<i>Tabla 1 Modelos genéticos con disfunción en el cotransportador KCC2. Modificado de Murillo et al., 2020.</i>	39
<i>Tabla 2 Modelos genéticos con disfunción en el cotransportador NKCC1</i>	41
<i>Tabla 3 Modelos genéticos en humanos con disfunción en el cotransportador KCC2. Modificada de Duy et al., 2019.</i>	43
<i>Tabla 4 Relación de la eficacia de algunos fármacos antiepilépticos utilizados en la propagación de la actividad epiléptica. Modificada de Khatap et al., 2021.</i>	53

Lista de abreviaturas

AcAc: Acetoacetato.	LCM: Lacosamida.
BZD: Benzodicepinas.	Leu: Leucina.
CA: Cornu Ammonis 1 y 3.	LEV: Levetiracetam.
CBD: Cannabidiol.	LTC: Lamotrigina.
CBZ: Carbamazepina.	NCC: Cotransportador de Na ⁺ -Cl ⁻ .
CCC: Cotransportadores electroneutros de cationes acoplados a cloruro.	NKCC1: Cotransportador de Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ .
CCT: Carboxilos terminales.	PB: Fenobarbitúricos.
Cl: Cloruro.	PER: Perampanel.
[Cl]_i: Concentración de cloruro intracelular.	Phe: Fenilalanina.
CUL3/KLHK3: Complejo ligasa de ubiquitina.	PTH: Fenitoína.
DC: Dieta cetogénica.	OSR1: Cinasa sensible al estrés oxidativo 1.
E_{Cl}: Potencial de equilibrio del Cl ⁻ .	SLC12: Solute Carrier Family 12.
E_{GABA}: Potencial de reversión de GABA	SE: Estado epiléptico.
EEG: Encefalograma.	Ser: Serina.
FAE: Fármacos antiepilépticos.	SNC: Sistema Nervioso Central.
GABA: Ácido γ-aminobutírico.	SPAK: Cinasa rica en prolina/alanina relacionada con Ste20/SPS1
GABA_AR: Receptor de GABA tipo A.	Thr: Treonina.
GABA_BR: Receptor de GABA tipo B.	TPM: Topiromato.
GAD: Ácido Glutámico decarboxilasa.	VIAAT: Transportadores de aminoácidos inhibitorio vesicular.
Gly: Glicina.	V_m: Potencial de membrana.
HB: Hidroxibutirato.	VPA: Ácido Valpórico.
HCO₃⁻: Bicarbonato.	WNK: Cinasa libre de lisina (K).
ILAE: Liga Internacional Contra la Epilepsia.	WT: Wild type.
KCC2: Cotransportador de K ⁺ -Cl ⁻ .	ZN: Zonisamida.

1 Planteamiento del problema

La epilepsia es una enfermedad neurológica crónica que afecta aproximadamente a 50 millones de personas a nivel mundial, en México la prevalencia de la epilepsia es de una tasa aproximada de 3.9 a 42.2 por cada 1000 habitantes. La incidencia de esta enfermedad genera altos índices de mortalidad, comorbilidad psiquiátrica, aislamiento social y discapacidad; es desgastante y devastador, para quien la padece y para su entorno familiar social. Por esta razón, es importante entender los mecanismos exactos por los cuales se origina este padecimiento. Existe una evidencia creciente en la literatura que sugiere que la epileptogénesis resulta principalmente de un déficit de la inhibición de GABA regulada por la expresión de los cotransportadores NKCC1 y KCC2. Desafortunadamente, nuestra comprensión de los cambios moleculares que afectan al cerebro durante la epileptogénesis sigue siendo incompleta.

Aunque existen estudios actuales que se centran en la expresión de NKCC1 y KCC2 donde se sugiere que la plasticidad del cloruro alterada puede estar estrechamente relacionada con la epilepsia. Es necesario entender el mecanismo por el cual se genera la epileptogénesis para encontrar nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos antiepilépticos.

2 Pregunta de investigación

¿Cuáles son los eventos moleculares que involucran la concentración de Cl^- intracelular mediada por los cotransportadores NKCC1 y KCC2, que a su vez son regulados por la vía de las cinasas WNK-SPAK/OSR1 que altera el funcionamiento cerebral durante la epileptogénesis?

3 Objetivo general

Realizar una investigación bibliográfica actualizada a partir del año 1971 hasta el año 2021 acerca de la regulación de la neurotransmisión de GABA mediada por la función de la vía WNKs-SPAK/OSR1-CCC en la epileptogénesis y sus implicaciones en el tratamiento de la epilepsia.

3.1 Objetivos particulares

1. Recopilar información bibliográfica actual, sobre los mecanismos de acción de la epilepsia.
2. Describir las implicaciones de la neurotransmisión GABAérgica durante el desarrollo de una crisis convulsiva.
3. Describir la plasticidad de la concentración de Cl^- intracelular regulada por NKCC1 y KCC2 durante el foco epiléptico.
4. Describir la relación de la fosforilación de NKCC1 y KCC2 mediante la vía WNKs-SPAK/OSR1 y sus implicaciones durante la actividad epiléptica.
5. Proponer como diana terapéutica la inhibición de la vía WNKs-SPAK/OSR1 para el tratamiento de los síntomas de la epilepsia.

4 Método

Se realizó una revisión bibliográfica sistematizada mediante la búsqueda inicial de estudios relevantes que contenían información sobre la regulación de los cotransportadores NKCC1 y KCC2 mediante la vía WNK-SPAK-OSR1 y las implicaciones de este mecanismo en la epilepsia. Además, de una búsqueda en artículos sobre el estudio a través de la historia de este padecimiento para comprender el alcance de este tema. Se utilizaron sitios web y motores de búsqueda como PubMed, SciELO, Mendeley, Frontiers, Elsevier, por mencionar algunos. Se definieron los criterios de búsqueda en los cuales se incluyeron las palabras, enunciados o conceptos clave (Keywords) para la búsqueda como: epilepsia, epileptogénesis, convulsiones, tipos de epilepsia, síndromes de epilepsia, incidencia de la epilepsia, prevalencia de la epilepsia, neurotransmisor GABA, receptor GABA_A, receptor GABA_B, GABA, ácido γ -aminobutírico, síntesis de GABA, SPAK, WNKs, cotransportadores electroneutros acoplados a catión-cloruro, NKCC1, KCC2, concentración intracelular de Cl⁻, mutaciones humanas de KCC2 y NKCC1, regulación de Cl⁻, epilepsia en modelo animal, modelos genéticos de ratón de KCC2 y NKCC1, tratamientos farmacológicos de la epilepsia y tratamientos no farmacológicos de la epilepsia, y sus equivalentes en el idioma inglés. Se seleccionaron aquellos artículos publicados en español o inglés que en su resumen contenía información relevante además de trabajos referenciados en los artículos consultados antes de proceder a la selección del texto completo de los artículos potencialmente relevantes, con la finalidad de elegir aquellos artículos que contengan estudios novedosos y actuales.

La búsqueda realizada cubre el periodo de 1971 hasta agosto del 2021, fecha de la realización de la última búsqueda. Una vez que se obtuvieron los textos completos, se procedió a leer de forma sistematizada y se analizó la información resaltando ideas principales. Además, se generó una base de datos organizada por año y tema, para facilitar el uso del material obtenido. Se incluyeron los trabajos más actuales y que contienen aportes de información relevante sobre la vía WNK-SPAK/OSR1-CCC y sus implicaciones en el desarrollo de la epilepsia.

5 Introducción

La condición médica de la epilepsia es tan antigua como la aparición de los primeros vestigios de la humanidad, se pueden encontrar referencias a la epilepsia en los textos más antiguos de distintas civilizaciones, sobre todo en la antigua Grecia (Temkin, 1971; Magiorkinis *et al.*, 2014).

La primera descripción de las convulsiones epilépticas aparece en un texto de hace 2000 años a.C. está escrito en el idioma Acadio usado en la región Mesopotámica, en este escrito se describen los síntomas de un paciente que lo diagnosticaron con *antasubbû* que significa “La mano del pecado”, provocada por el dios de la luna, ya que presentaba contorsión de cuello a la izquierda, manos y pies tensos, ojos abiertos y espuma en la boca, además de no tener conciencia. Se han encontrado informes en antiguos textos médicos sobre la epilepsia del antiguo Egipto. Para el 1700 a.C. en el papiro quirúrgico de Edwin Smith se reportan casos de pacientes donde se refiere a que “tiemblan mucho”. Estas descripciones se elaboraron en relatos separados donde se cree que hace referencia a una epilepsia generada por alguna lesión o trauma en la cabeza, lo que indicaría que el origen de este padecimiento es en la cabeza. Por otro lado, la civilización babilónica también describió a la epilepsia, ellos creían que esta condición se debía atribuir a los espíritus malignos. Mencionan que si en el momento del ataque el paciente pierde el conocimiento y sus brazos y piernas se doblan hacia el mismo lado del cuello, se diagnosticaría como *miqtu* (nombre que usaba la civilización babilónica para referirse a la epilepsia). Uno de los textos babilónicos más antiguos (1067-1046 a.C.) donde se describen todas las enfermedades es el texto *Sakikku-miqtu*, se hace referencia a la epilepsia con los términos *antasubba* (enfermedades de las caídas, en sumerio) y *miqtu*, describen los signos a identificar para el pronóstico, diagnóstico y tratamiento de la

afección. Hace mención de convulsiones febriles, convulsiones en lactantes, convulsiones parciales simples y complejas, convulsiones gelásticas, estado epiléptico y narcolepsia (Magiorkinis *et al.*, 2010).

Otro escrito que hace referencia a la epilepsia es el código Hamurabbi (1790 a.C.) donde se describen síntomas de epilepsia en esclavos, denominada como *Bennu*. En el siglo VI a. C. en el texto de *Caraka Samhita Sutra* de la medicina india, el autor y médico Atreya (padre de la medicina hindú) atribuye la epilepsia a una disfunción cerebral y no a una intervención divina. Define a la epilepsia como: Pérdida paroxística del conocimiento debido a una alteración de la memoria y la comprensión de la mente acompañada de ataques convulsivos. Se describen cuatro tipos diferentes de epilepsia y un tipo de epilepsia llamada *Abasmara* donde el paciente pierde la memoria (Magiorkinis *et al.*, 2010, 2014). Más tarde, en el libro clásico de medicina del emperador Huang Di Nei Jing (770-221 a. C.) se considera que las crisis convulsivas son congénitas y las describe bajo el nombre de *Dian-Kuang* (epilepsia-psicosis) (Lai & Lai, 1991).

Los primeros escritos que reportan algún tratamiento contra la epilepsia son los textos hipocráticos, por ejemplo, Hipócrates en su libro *On Sacred Disease* describe sobre las observaciones en las que heridas cerebrales podían causar convulsiones y que debían ser trepanadas. De esta forma la evidencia sugería que el origen de esta enfermedad es en el cerebro y que una posible cura es la trepanación. Sin embargo, no fue hasta principios del siglo XVIII y XIX, cuando la epilepsia se emancipó de las supersticiones religiosas (Temkin, 1971). En estos siglos hubo avances muy importantes en la medicina lo que contribuyó a un desarrollo mayor con respecto a la investigación acerca de la epilepsia, se seguía usando como tratamiento para la epilepsia la trepanación, pero en menor medida (Meador *et al.*, 1989). A principios del S. XVIII la opinión de la epilepsia hacía referencia a que era una

enfermedad idiopática derivada de traumatismos craneoencefálicos y que prevalece en el cerebro y otros órganos. Posteriormente un gran aporte a la epileptología moderna fue el trabajo de William Cullen y Samuel A. Tissot (1770-1791), quienes describieron con precisión varios tipos de epilepsia, anatomía y fisiología de la enfermedad. A principios del S. XIX, en Francia se publicaron diversos trabajos en el campo de la epileptología elaborados por médicos franceses como Maisonneuve, Calmeil y Jean Etienne Dominique Esquirol. Maisonneuve destacó la importancia de la hospitalización de pacientes epilépticos, clasificó la epilepsia en idiopática y simpática y describió el llamado *aura sensible* de la epilepsia simpática. Esquirol junto con sus alumnos distinguió la gravedad de la epilepsia entre *petit* y *grand mal*, estudiaron sistemáticamente la locura y la epilepsia realizando estudios clínicos y *post mortem*. Durante la segunda mitad del S. XIX las investigaciones se delimitaron a la fisiopatología de la epilepsia y la localización topográfica de las crisis epilépticas. Se derivaron importantes trabajos sobre la epileptogénesis, etiología y taxonomía de la epilepsia.

En el trabajo titulado “Sobre la excitabilidad eléctrica del cerebro” del fisiólogo Gustav Fritsch y el psiquiatra Edouard Hitzing, destacan un aporte importante ya que delimitaron los mecanismos epilépticos y dieron la prueba de que la epilepsia se deriva del cerebro. Sin embargo, la obra de John Hughling Jackson establece la base científica de la epileptología, su investigación culmina enfatizando la existencia de lesiones localizadas en la corteza cerebral involucradas en convulsiones epilépticas. A inicios del S. XX, el patólogo, histólogo y neurocientífico español Santiago Ramón y Cajal realizó importantes avances en el campo de la estructura microscópica del cerebro y el sistema nervioso ya que fue el primero en describir las estructuras de las neuronas y la sinapsis. Posteriormente Gowers publicó el libro titulado “The Borderlands of Epilepsy”, donde se centraba en hablar de desmayos, ataques vagales y vasovagales, migraña, vértigo y algunos síntomas del sueño especialmente

narcolepsia. En la década de 1920 Lennox y Cobb publicaron una monografía titulada “The Relation of certain Physicochemical Processes to Epileptiform Seizures”, aquí se describen los efectos de varios estímulos para la generación de convulsiones epilépticas como la inanición, dieta cetogénica y falta de oxígeno, la mayoría de ellos con resultados negativos. En la segunda mitad del S. XX se realizaron importantes descubrimientos en el campo de la neurociencia y en la fisiología de la sinapsis, estos descubrimientos fueron un aporte importante para la epilepsia psicomotora. Además, se descubrieron mecanismos y rutas de acción en el cerebro, así como la implicación del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) con la excitabilidad neuronal y la epilepsia. Actualmente se siguen estudiando los mecanismos de acción que generan la epilepsia. Cabe destacar que con el avance de la tecnología se han desarrollado nuevas técnicas para el monitoreo de las convulsiones epilépticas, comportamiento y propagación. Esta tecnología abarca desde video monitoreo, electroencefalograma, magnetoencefalografía, entre otros, que han ayudado al estudio y desarrollo de estrategias terapéuticas para entender y tratar este padecimiento (Meador *et al.*, 1989; Magiorkinis *et al.*, 2010, 2014).

6 Epilepsia

La Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés) define a la epilepsia como un trastorno cerebral que se caracteriza por una predisposición continua que genera crisis epilépticas producidas por actividad neuronal cerebral anormal, excesiva y sincronizada (Fisher *et al.*, 2014; Scheffer *et al.*, 2017). Estas crisis son episodios breves de movimientos involuntarios que pueden afectar a una parte del cuerpo (convulsiones parciales) o a su totalidad (convulsiones generalizadas) y a veces se acompañan con pérdida de la consciencia y del control de esfínteres. Estas convulsiones son causadas por un desequilibrio entre la excitabilidad neuronal y su inhibición, con una tendencia hacia la excitabilidad. Durante una convulsión, las neuronas GABAérgicas del giro dentado e hipocampo son sometidas a despolarizaciones prolongadas, lo que resulta en cambios en el foco epiléptico con alteraciones en la liberación del GABA, incremento de la excitación sináptica, o cambios en la concentración extracelular de los iones potasio o calcio (De Cabo *et al.*, 2006). El origen de esta enfermedad se debe a múltiples razones. En algunos casos subyace una base genética, pero generalmente la epilepsia es causada por traumatismos y daño cerebral originados por lesiones prenatales o perinatales; anomalías congénitas o malformaciones corticales; traumatismos craneoencefálicos o hemorragias; accidentes cerebrovasculares; infecciones neurales tales como meningitis, encefalitis y neurocisticercosis; etiologías genéticas; errores metabólicos; y tumores cerebrales (OMS, 2015; ILAE, 2021).

6.1 Epidemiología

La epilepsia representa una de las enfermedades crónicas más frecuentes, que afecta entre 50 a 65 millones de personas a nivel mundial, de las cuales 5 millones viven en el continente americano. Es una afección que no distingue edad o sexo y tiene una amplia distribución mundial que ocasiona altos índices de mortalidad, comorbilidad psiquiátrica, aislamiento social y discapacidad. Se estima que el 0.5% del total de la carga mundial de morbilidad es causado por la epilepsia (OMS, 2019).

Los índices de incidencia y prevalencia de la epilepsia a nivel mundial no son uniformes y dependen de varios factores tales como un diagnóstico temprano; diversidad de metodologías implementadas para la identificación de casos; acceso a sistemas de salud e información; condiciones socioculturales y económicas; estigma social; entre otras. Se han reportado estudios donde la prevalencia media mundial a lo largo de la vida es de 17.8 casos de cada 1000 habitantes y una incidencia de 77.7-190 de cada 100,000 habitantes (García & Serrano, 2018).

De acuerdo con Noriega & Shkurovich (2020) en México se han realizado diversos estudios epidemiológicos que han dado como resultados una prevalencia (número de casos activos, es decir, pacientes que hayan sufrido una crisis epiléptica en los últimos 5 años y/o se encuentran en tratamiento) de 3.9 a 42.2 por 1000 habitantes. Este dato se aproxima mucho a las cifras reportadas para América Latina y el Caribe donde las tasas oscilan alrededor de 92.7-190 casos de cada 100,000 habitantes/año siendo superiores a las de países desarrollados. Sugiriendo que la epilepsia presenta mayor prevalencia en países en vías de desarrollo como México (García & Serrano, 2018).

Debido a su prevalencia la epilepsia es una de las enfermedades neurológicas más importantes del mundo; la recurrencia de crisis, así como sus consecuencias físicas y psicológicas la hacen una enfermedad desgastante y devastadora para quien la padece y su entorno familiar. Incluyendo la estigmatización, discriminación y calidad de vida que sufren los pacientes a lo largo de este padecimiento (De Cabo *et al.*, 2006; OMS, 2019; ILAE, 2021).

6.2 Tipos de epilepsia

De acuerdo con la ILAE el marco actual de clasificación de la epilepsia se basa en un sistema multinivel donde en cada panel se consolidan distintos grados de integración diagnóstica, dependientes de recursos informativos con los que se cuentan para hacer un correcto diagnóstico médico de esta enfermedad. Se estipula la importancia de los tipos de crisis, tipo de epilepsia y si es originada por algún tipo de síndrome epiléptico para facilitar su detección y proporcionar un adecuado tratamiento. Desde un punto de vista clínico se han definido más de 40 tipos de epilepsia en seres humanos donde se hace énfasis al tipo de crisis (Sheffer *et al.*, 2017; ILAE, 2021).

Como se puede observar en el panel A de la figura 1, se establece cuales son los tipos de crisis epiléptica (definida como la aparición transitoria de signos y/o síntomas, secundarios a una actividad neuronal excesiva y sincrónica) de acuerdo con el sitio de origen de la actividad epiléptica, las crisis pueden tener un inicio focal, generalizado o desconocido (Fisher *et al.*, 2014).

En el panel B de la figura 1 podemos observar los tipos de epilepsia que se clasifican de acuerdo con el tipo de crisis convulsiva que presenta el paciente, si el origen de estas crisis es del tipo focalizadas, generalizadas, combinadas entre generalizadas y focales o de origen desconocido.

- a) Focal: Incluyen trastornos unifocales y multifocales, así como convulsiones que afectan a un hemisferio. Existen diferentes tipos de convulsiones, que incluyen convulsiones conscientes focales, de consciencia focalizadas, motoras focales, no motoras focales y tónico-clónicas de focal a bilateral.
- b) Generalizada: Las personas con epilepsias generalizadas pueden tener una variedad de tipos de convulsiones que incluyen convulsiones de ausencia, mioclónicas, atónicas, tónicas y tónico-clónicas. El diagnóstico de epilepsia generalizada se realiza sobre bases clínicas, apoyado por el hallazgo de descargas típicas de electroencefalograma (EEG).
- c) Combinada: Son pacientes que tienen convulsiones tanto generalizadas como focales. El diagnóstico se realiza sobre bases clínicas, respaldado por los hallazgos del EEG. El EEG interictal puede mostrar descargas generalizadas y epileptiformes focales. Algunos ejemplos comunes en los que ocurren ambos tipos de convulsiones son el síndrome de Dravet y el síndrome de Lennox-Gastaut.
- d) Desconocida: Se entiende que el paciente tiene epilepsia, pero el médico no puede determinar si el tipo de epilepsia es focal o general porque no hay suficiente información disponible. Esto puede ser por una variedad de razones. Si los tipos de convulsiones son desconocidos, entonces el tipo de epilepsia puede ser desconocido por razones similares, aunque los dos no siempre son concordantes.

En el panel C de la figura 1 se puede observar la etiología de los síndromes epilépticos. Estos hacen alusión a un conjunto de características clínicas, electroencefalografías, imagenológicas y de origen genético que ocurren simultáneamente y comparten un síntoma común de convulsiones no provocadas, tienen efectos adversos a largo plazo y constituyen un patrón común e identificable. Estos síndromes pueden ser: Síndrome de Lennox-Gastaut, Síndrome de West, Síndrome de Dravet, Epilepsia benigna infantil, Esclerosis temporal mesial, Síndrome de muerte súbita, Síndrome de Rett, Síndrome de Angelman, por mencionar algunos (Shorvon, 2011; Asadi-Pooya, 2018; Calderón *et al.*, 2018; Griffin *et al.*, 2018; Márquez, 2020).

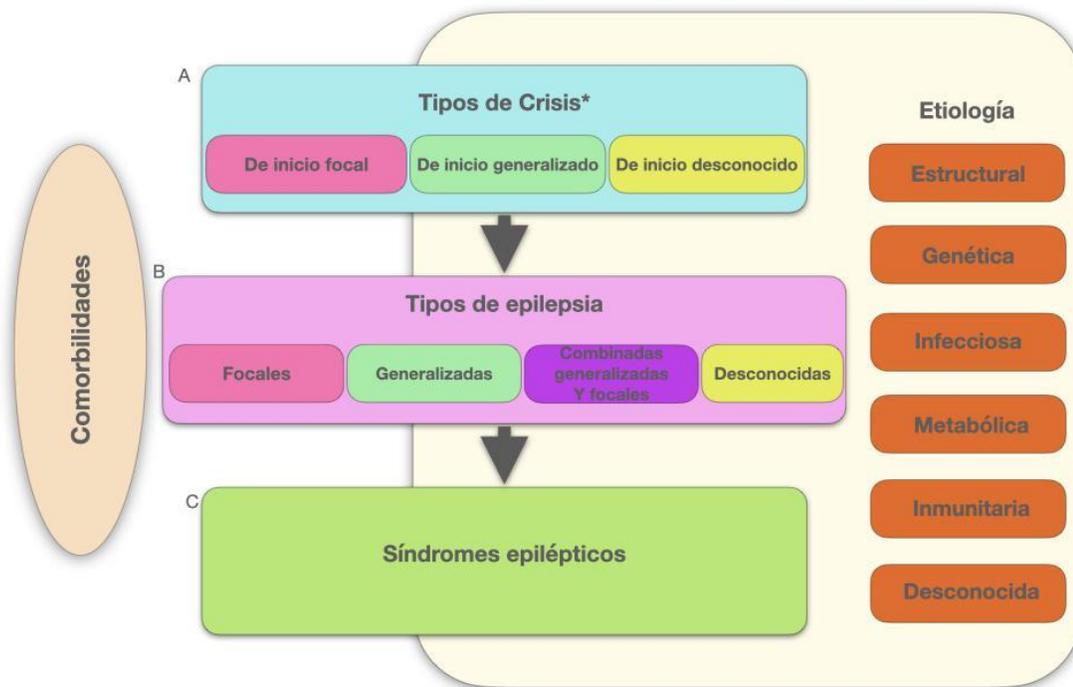


Figura 1 Marco para la clasificación de la epilepsia. Modificada de Scheffer *et al.*, 2017.

7 Neurobiología de la epilepsia

Se sabe que algunos trastornos neurológicos y neuropsiquiátricos son causados por la reducción de la inhibición GABAérgica. Sin embargo, los mecanismos moleculares responsables de transformar un cerebro normal a un cerebro patológico aún no se comprenden totalmente (Ben-Ari, 2017; Moore *et al.*, 2017).

Una convulsión es un aumento transitorio de la actividad eléctrica del cerebro que puede ser provocado por una variedad de factores, como alteraciones metabólicas, infecciones o algunos fármacos. Cuando una convulsión surge de forma espontánea se le considera epilepsia, pero nuestro conocimiento de los mecanismos neurofisiológicos que hacen que el cerebro sea epileptogénico sigue siendo incompleto, lo que refleja la falta de tratamientos eficaces para este padecimiento (Duy *et al.*, 2019). Las convulsiones se pueden clasificar en dos tipos, convulsiones parciales y convulsiones primarias generalizadas, Además, una convulsión se divide en tres etapas: aura, ictus y postictal. La etapa de aura la experimenta el paciente cuando comienza a mostrar sensaciones anormales como náuseas, dolores de cabeza, sentidos anormales y emociones repentinas (miedo, pánico, etc.), posteriormente el paciente entra a la etapa de ictus en la que los síntomas pueden ser convulsivos (sacudidas vigorosas del cuerpo y pérdida del conocimiento) o no convulsivos (incapacidad para responder y espasmos musculares), según sea el tipo de convulsión, después sigue la etapa postictal o etapa de recuperación donde el paciente comienza a experimentar síntomas posteriores a la convulsión como somnolencia, confusión y parálisis parcial (Johan *et al.*, 2018).

Clásicamente se piensa que la epilepsia surge de un desequilibrio de la neurotransmisión GABAérgica, lo que resulta en un estado hiperexcitable que es propenso a la actividad convulsiva (Ben-Ari *et al.*, 2007; Jansen *et al.*, 2010; Kahle *et al.*, 2014; Duy *et al.*, 2019).

El GABA, un aminoácido no proteico de cuatro carbonos es uno de los principales neurotransmisores inhibidores en el sistema nervioso central (SNC), su función principal es el control de la excitabilidad y maduración neuronal e interviene en los procesos de comunicación entre neuronas, plasticidad, sincronización y formación de redes emergentes además de la migración neuronal (Liu *et al.*, 2020). Es sintetizado a partir de la descarboxilación del glutamato por la enzima ácido glutámico decarboxilasa (GAD, por sus siglas en inglés) en sus dos isoformas GAD65 y GAD67, esta enzima cataliza la reacción que transforma el ácido Glutámico en GABA, que a su vez es dependiente del cofactor peridoxal 5'-fosfato (Vitamina B₆). La síntesis de GABA está inmersa en un conjunto metabólico mucho más complejo, donde además están incluidos otros aminoácidos que actúan en la neurotransmisión y que en general provienen del ciclo de Krebs. Cuando las neuronas GABAérgicas son activadas producen GABA. El GABA generado se almacena y es transportado por proteínas vesiculares sinápticas conocidas como transportadores de aminoácido inhibitorio vesicular (VIAAT) y es liberado desde la terminal nerviosa hacia hendiduras sinápticas por proteínas transportadoras como GAT-1 a GAT-4. Estas proteínas utilizan gradientes de Cl⁻ y Na⁺. El GABA liberado se une a sus receptores (GABA_{A-C} R) en la membrana de la neurona postsináptica, actuando, así como un neurotransmisor (Figura 2) (Hyde *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2013).

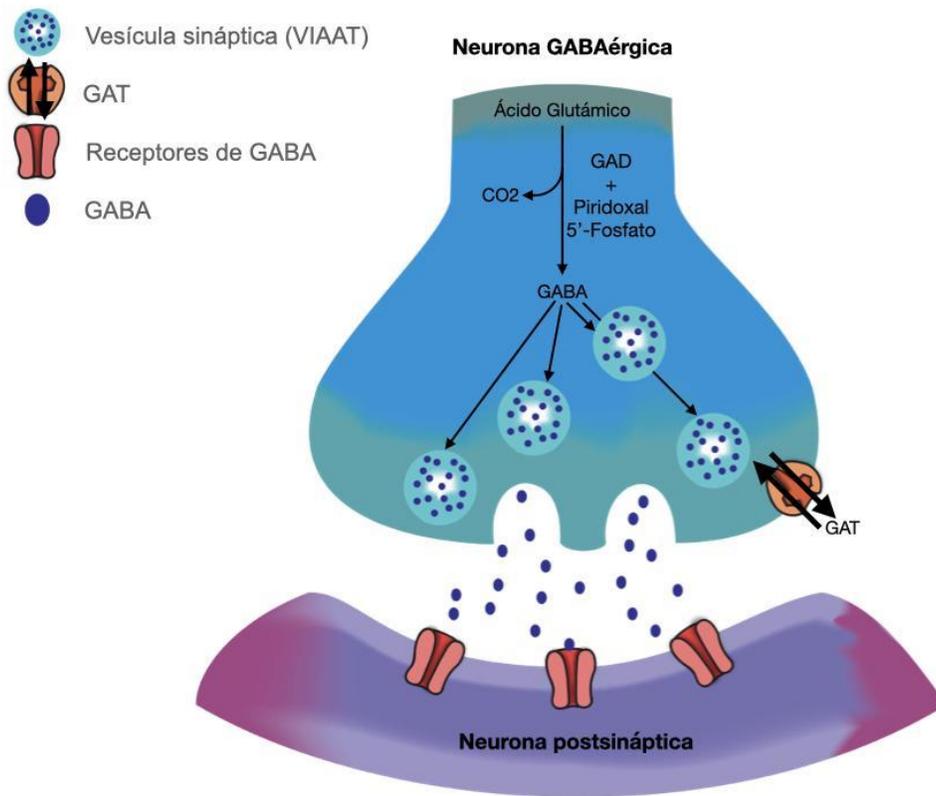


Figura 2 Síntesis del neurotransmisor GABA. Modificada de Jin *et al.*, 2013.

El GABA actúa principalmente sobre dos tipos de receptores: el GABA_A y el GABA_B, estos receptores son canales iónicos activados por ligandos. El primero es un receptor que hiperpolariza a la neurona a través de un incremento en la conductancia del cloruro lo que resulta en un efecto inhibitorio rápido y es típicamente postsináptico.

El receptor GABA_A (GABA_A R) es una glicoproteína de 275 kDa, media la acción postsináptica inhibitoria ya que es preferentemente selectivo a iones de Cl⁻ y en menor grado para el radical bicarbonato (HCO₃⁻), se encuentra extendido por todo el sistema nervioso, es heteropentamérico ya que se conforma de moléculas proteicas oligoméricas, que pueden estar formadas por 6 subunidades polipeptídicas α , 3 β , 4 γ , δ , ϵ , π , θ y 3 ρ (Jansen *et al.*, 2010).

Cuando GABA se une a GABA_A R desencadena cambios conformacionales en el receptor que funciona como un canal de cloruro activados por ligando y esto permite la apertura rápida y sincronizada del canal a los iones de Cl⁻ facilitando la entrada y salida pasiva de Cl⁻ dependiendo de su potencial de equilibrio, lo que conduce a la hiperpolarización o despolarización de la membrana dependiendo de la [Cl⁻]_i y la madurez de la neurona (Ben-Ari *et al.*, 2012). La dirección del flujo de iones depende de la fuerza impulsora electroquímica que actúa sobre los iones Cl⁻, que es la diferencia entre el potencial de membrana de la célula (V_m) y el potencial de equilibrio de Cl⁻ (E_{Cl⁻}). Este último depende del gradiente de Cl⁻ a través de la membrana celular (Murillo *et al.*, 2020). Es utilizado como diana molecular para diferentes clases de fármacos como: benzodiazepinas, barbitúricos, los neuroesteroides, los anestésicos intravenosos: propofol y etaminato, los anestésicos de inhalación y el alcohol (Uusi-Oukari & Korpi, 2010).

Por otro lado, el receptor GABA_B (GABA_B R) es un heterodímero obligatorio, con dos subunidades especializadas diferentes: GABA_{B1} y GABA_{B2}. Es un tipo de receptor asociado a proteínas G acoplado a diferentes mecanismos efectoros que hiperpolarizan a la neurona. Las vías de señalización del GABA_B R involucran una de las tres proteínas efectoras que pueden ser: Canales de Ca⁺⁺ dependientes de voltaje, canales de K⁺ activados por la proteína G y la adenil ciclasa lo que resulta en un efecto inhibitor lento ya que depende de la proteína G como segundo mensajero para mediar la respuesta. Este receptor se localiza en la membrana presináptica donde modula la liberación del neurotransmisor y en la membrana postsináptica donde participa en la hiperpolarización de neuronas conduciendo a la inhibición neuronal además tiene una participación en la liberación bloqueada de neurotransmisores como L-glutámico, noradrenalina, dopamina, 5-hidroxitriptamina, sustancia P, entre otros (Frangaj & Fan, 2018).

7.1 Función de GABA en neuronas inmaduras y maduras

Desde el nacimiento y a lo largo del desarrollo humano la estimulación GABAérgica es importante en la maduración neuronal. En condiciones normales durante el desarrollo prenatal a un desarrollo postnatal, la neurotransmisión por GABA sufre un cambio de excitadora a inhibidora debido a una inversión de los gradientes de cloruro. Las corrientes iónicas dependientes de voltaje generadas por transmisores cambian de corrientes lentas y de larga duración a corrientes rápidas y bloqueadas por el tiempo. Con base en esto, se sugiere que las neuronas que no siguen su programa y están mal ubicadas o conectadas desvían las secuencias de desarrollo de las corrientes iónicas. Esto conduce a la presencia de neuronas que adoptan gradientes de cloruro transmembrana que se parecen fenotípicamente a neuronas inmaduras en el cerebro adulto, lo que en consecuencia hace que la actividad de GABA sea excitadora en lugar de inhibitoria. Esta pequeña población de neuronas hiperexcitables genera una descarga eléctrica, se sincronizan, posteriormente se incorporan redes progresivamente más grandes y se producen convulsiones (Kahle *et al.*, 2008; Watanabe & Fukuda, 2015; Ben-Ari, 2017). En general, las convulsiones evolucionan a través de tres fases principales; iniciación (aura), propagación (ictal) y terminación (postictal), y en cada una de las fases es regulada por diferentes mecanismos. Una vez que comienza el proceso que da origen a una convulsión, se propaga a través de diferentes regiones del cerebro mediante diversos patrones espacio-temporales (Khateb *et al.*, 2021).

Cuando se activan los receptores de GABA da como resultado la entrada de Cl^- y la hiperpolarización de la membrana plasmática dependiendo de la $[\text{Cl}^-]_i$. Sin embargo, durante las primeras etapas del desarrollo del cerebro, las neuronas tienen una $[\text{Cl}^-]_i$ elevada (alrededor de 20-40 mM), el potencial de equilibrio del Cl^- tiende a lo positivo comparado

con el potencial de reposo y la activación de los receptores GABA. La estimulación de GABA en el GABA_AR promueve el influjo de Cl⁻, esto conduce a la despolarización de la membrana y a la excitación neuronal. La acción excitadora de GABA en el SNC inmaduro es muy importante para el desarrollo del sistema nervioso donde la composición de las subunidades de los receptores de GABA_A tienden a cambiar durante el desarrollo prenatal y posnatal (Figura 3) (Schomberg *et al.*, 2003; Jansen *et al.*, 2010).

Por otro lado, en neuronas adultas, la concentración de cloruro intracelular [Cl⁻]_i es relativamente bajo (alrededor de 5-12 mM), con un potencial de inversión del Cl⁻ cerca del potencial de membrana en reposo (V_m) aproximadamente -60mV, lo que permite la apertura del canal del GABA_A R. Cuando GABA es liberado en la brecha sináptica y se une a su receptor da lugar al flujo de Cl⁻ hacia el interior de la célula hasta igualar las concentraciones de Cl⁻, y este aumento de la [Cl⁻]_i es el responsable del incremento de cargas negativas lo que conduce a la hiperpolarización de la membrana postsináptica generando que la neurona no dispare un potencial de acción que conduce a la inhibición neuronal (Figura 3) (Kahle *et al.*, 2008; Ben-Ari *et al.*, 2012; Murillo *et al.*, 2020).

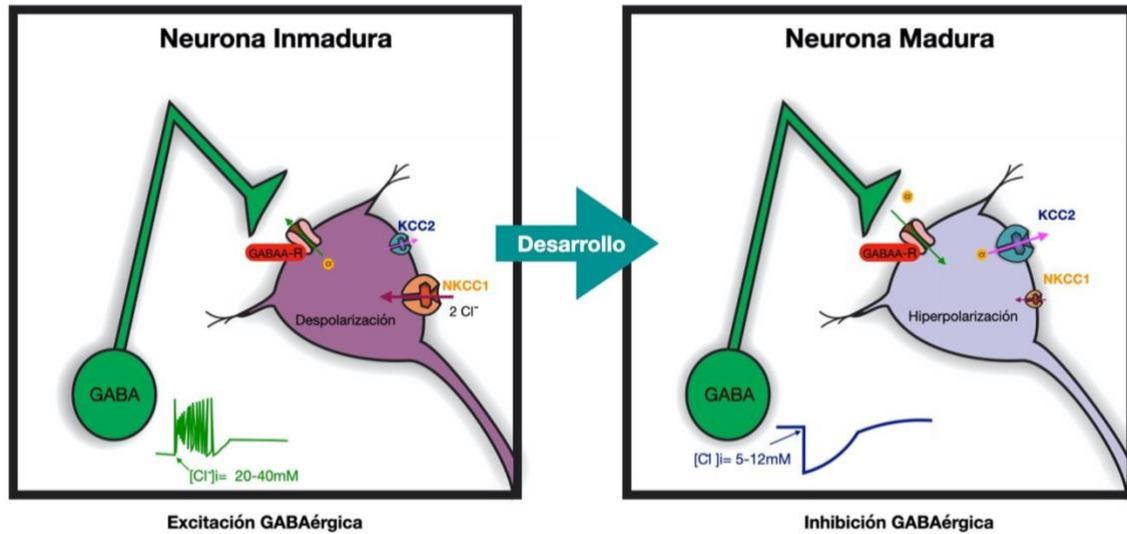


Figura 3 Secuencia de desarrollo de acciones de GABA

Secuencia de desarrollo de acciones de GABA de excitador a inhibidor en la maduración cerebral y trastornos neurológicos. Modificado de Ben-Ari *et al.*, 2012.

8 Cotransportadores CCC

Una de las funciones de los mecanismos de transporte neuronal más importantes es el mantenimiento del equilibrio osmolar que se da a partir del gradiente electroquímico del Cl^- transmembrana (Gamba, 2005). Este movimiento del Cl^- dirigido hacia el exterior o interior de la neurona representa un factor clave para mantener la eficacia de la transmisión inhibitoria o excitatoria rápida de GABA. Dando como resultado la apertura de los canales iónicos activados por ligando a través de los receptores postsinápticos GABA_A o glicina (Di Cristo *et al.*, 2017).

La señalización GABAérgica es única y la polaridad de sus acciones dependen de la $[\text{Cl}^-]_i$. Esta concentración durante la maduración neuronal es muy lábil, lo que conduce a acciones despolarizantes e incluso excitadoras en determinadas condiciones patológicas como la epilepsia (Ben-Ari *et al.*, 2012). La $[\text{Cl}^-]_i$ es intrínsecamente más baja en las neuronas adultas con un cambio en el desarrollo de las acciones de GABA. Esta actividad se ve

afectada causando un retorno a un estado inmaduro en términos de $[Cl^-]_i$; después de presentar convulsiones, lesiones de la médula espinal y otras afecciones patológicas. Esta diferencia en la $[Cl^-]_i$ entre el sistema nervioso maduro e inmaduro y en condiciones patológicas se debe principalmente a alteraciones de los niveles de expresión y a la actividad de los cotransportadores catión-cloruro (Moore *et al.*, 2017).

De tal forma que los cotransportadores de la familia SLC12 (Solute Carrier Family 12, por sus siglas en inglés) y el neurotransmisor GABA están asociados con enfermedades cerebrales y del comportamiento como autismo, ansiedad, espasticidad, dolor neuropático, alzheimer, esquizofrenia, edema cerebral y epilepsia, en donde la desregulación de la actividad de la isoforma 1 del cotransportador de Na^+K^+2Cl (NKCC1) y a la isoforma 2 del cotransportador de K^+Cl^- (KCC2) con la consiguiente alteración de la homeostasis de la $[Cl^-]_i$ altera la inhibición inducida por GABA (Kahle *et al.*, 2008; Jansen *et al.*, 2010; Ben-Ari, 2017; Frangaj & Fan, 2018; Murillo *et al.*, 2020; Solomon *et al.*, 2021).

A pesar de que el correcto funcionamiento de la transmisión neuronal depende del equilibrio de electrolitos tales como la acumulación de Cl^- en neuronas inmaduras y patológicas, se sabe que este mecanismo está relacionado con la eficacia del funcionamiento de los cotransportadores electroneutros de cationes acoplados a cloruro (CCC) en particular, NKCC1 y KCC2, que importan y exportan cloruro respectivamente. Pertenecen a la familia de glicoproteínas de transporte conocida como SLC12. La función de las proteínas de esta familia depende del gradiente electroquímico generado por los transportes primarios como la $Na^+K^+ATPasa$. Por esta razón son conocidos como transportadores secundarios. Cada cotransportador presenta pesos moleculares aparentes de 120 a 200 kDa. Actualmente se han identificado nueve miembros de esta familia codificados por los genes SLC12a 1-9 como se muestra en el árbol filogenético representado en la figura 4. Esta familia se divide

funcionalmente en dos ramas, sólo se han descrito siete miembros, entre los cuales se encuentran dos cotransportadores de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ sensibles a diuréticos de asa como bumetanida (NKCC1-NKCC2), el cotransportador de $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ sensible a tiazidas (NCC) y los cotransportadores que translocan $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ (KCC) que son codificados por al menos cuatro genes homólogos (KCC1-KCC4), de los cuales se generan isoformas por empalme alternativo de exones. Es así como NCC, NKCCs translocan iones hacia el interior de la célula, siguiendo el gradiente favorable para el transporte de sodio, mientras que los KCCs, lo hacen desde el interior hacia el exterior de la célula, siguiendo el gradiente favorable para el potasio (Gamba, 2005; Kahle *et al.*, 2008; Arroyo *et al.*, 2013; Mercado & Melo, 2014; Melo, 2014; Liu *et al.*, 2020).

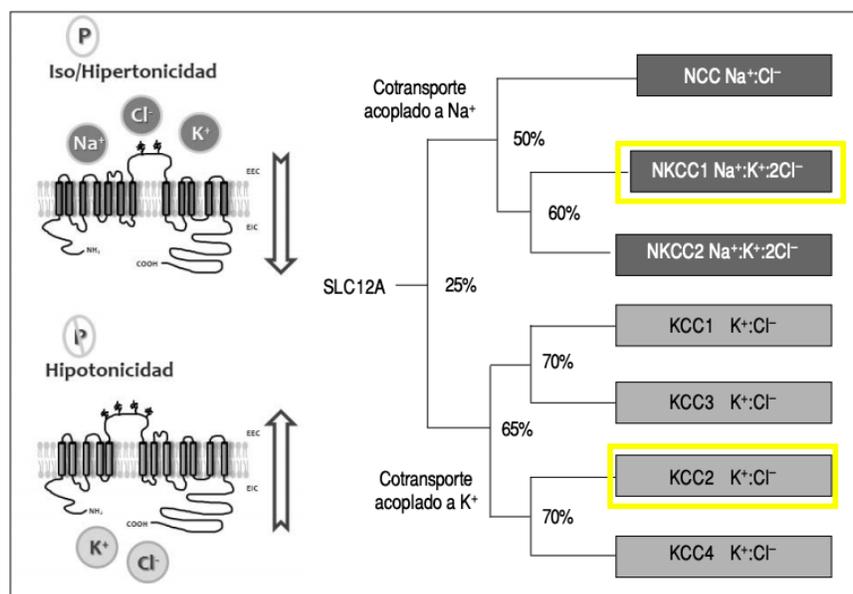


Figura 4 Árbol filogenético de los cotransportadores catión-cloruro.

Se subdivide en dos ramas, la primera esta compuesta por tres miembros que codifican para cotransportadores que utilizan sodio como catión para acoplarse al transporte de cloro (NCC, NKCC1 y NKCC2). La otra rama esta compuesta por cotransportadores que emplean el potasio como catión acoplado al cloro (KCC1-4). En los recuadros amarillo se encuentran NKCC1 y KCC2, cotransportadores implicados en la regulación del cloruro intra-neuronal y en el desarrollo de la epilepsia. Tomada de Mercado & Melo, 2014.

8.1 Regulación de la actividad del cotransportador Cation-Cloruro K^+ - Cl^- Isoforma 2 (KCC2) en la epilepsia

Los cotransportadores de K^+ - Cl^- o KCCs son proteínas de membrana que transportan K^+ y son extrusores específicos del Cl^- que no generan cambios en el potencial membranal. Son transportadores de iones activos secundarios debido a que utilizan los gradientes establecidos por el transporte activo primario, contribuyen a mantener la homeostasis celular tanto del agua, como de los electrolitos. Están codificados por SLC12A4, SLC12A5, SLC12A6 y SLC12A7, todos comparten 65-70% de identidad de su secuencia proteica, entre los cuales se encuentran 4 genes: KCC1, KCC2, KCC3 y KCC4 que se localizan en los cromosomas 16q22, 20q13, 15q13-14 y 5p15,3 respectivamente, la expresión de KCC1, KCC3 y KCC4 es ubicua, mientras que la expresión de KCC2 es exclusivamente en la membrana plasmática de somas y dendritas en neuronas piramidales e interneuronas del hipocampo (CA1-4), cerebelo y en todas las capas del neocórtex (Gamba, 2005; Arrollo *et al.*, 2013). Existen dos isoformas KCC2_a y KCC2_b. La isoforma KCC2_a presenta 40 aminoácidos en el extremo amino terminal codificados en el exón alternativo. La isoforma de KCC2_b es responsable de establecer la transmisión mediada por el receptor GABA_A hiperpolarizante. Ambas isoformas se encuentran en el SNC. La diferencia entre cada isoforma radica en el momento del desarrollo celular en el que se expresan. La expresión depende del desarrollo embrionario: en etapas neonatales la función de cotransporte K^+ - Cl^- depende de KCC2_a y aproximadamente dos semanas después del nacimiento cuando ya la neurona madura depende de KCC2_b (Mercado & Melo, 2014; Melo, 2014; Liu *et al.*, 2020).

En condiciones fisiológicas normales, el cotransportador KCC2 se expresa cuando la $[Cl^-]_i$ está elevada y requiere estar desfosforilado para su función. Regula la $[Cl^-]_i$ en diversas

neuronas ya que extrae Cl^- intracelular. En este sentido, cuanto mayor sea la actividad del KCC2, menor será la concentración de cloruro. El gradiente de cloruro que crea el KCC2 produce la hiperpolarización de la membrana celular promoviendo que GABA actúe como estímulo inhibitor. Sin embargo, si KCC2 se encuentra inactivo o ausente, la concentración intraneuronal de cloruro aumenta, lo que produce una despolarización de la membrana y de forma contraria GABA actúa como estímulo excitador. La actividad de este cotransportador es importante para mantener la neurotransmisión GABAérgica hiperpolarizante (Chamma *et al.*, 2012; Di Cristo *et al.*, 2017). Después del nacimiento, el GABA se vuelve inhibitor en numerosas neuronas debido a la expresión de KCC2, el cual mantiene en niveles bajos la $[\text{Cl}^-]_i$, con lo que convierte los valores de E_{Cl} negativas a un potencial de membrana en reposo, de esta forma se activa el GABA_A R resultando en la afluencia neta del Cl^- y se hiperpolariza la membrana (Figura 5)(Chamma *et al.*, 2012).

La acción despolarizante e incluso excitadora de GABA debido a un $[\text{Cl}^-]_i$ elevada es un fenotipo conservado evolutivamente de las neuronas inmaduras, además relacionado con el aumento posnatal tardío en la actividad del cotransportador KCC2, trabajos previos han demostrado que el nivel de expresión general de KCC2 es lo suficientemente alto en el hipocampo neonatal como para que la estimulación rápida y dependiente de la actividad de KCC2 pueda provocar un cambio negativo de E_{GABA} cercano al nivel adulto (Kahle & Delpire, 2016). La importancia de KCC2 en el mantenimiento de la fuerza de la inhibición sináptica destaca su posible implicación en la epilepsia, ya que es un trastorno de hiperexcitabilidad neuronal que se cree que surge de una inhibición neuronal alterada (Duy *et al.*, 2019).

Se ha reportado que la reducción en la función de KCC2, disminuye la eficacia de la inhibición hiperpolarizante, se aumenta la excitabilidad y la susceptibilidad a las convulsiones (Woo *et al.*, 2002; Ben-Ari *et al.*, 2007; Kahle & Delpire, 2016; Moore *et al.*, 2017). De acuerdo con esta noción, en un estudio de seguimiento a pacientes que padecían epilepsia del lóbulo temporal y esclerosis del hipocampo, a quienes se les realizó cirugía de resección de la zona epileptogénica y se analizaron los tejidos, se encontró una actividad despolarizante en un 20% desde el reposo en las células piramidales subculares y una pérdida de la función de KCC2 durante estallidos epileptiformes, esto sugiere que una homeostasis alterada del cloruro en células piramidales y una actividad despolarizante GABAérgica tiene relación con la regulación a la baja de KCC2 durante el foco epiléptico (Huberfeld *et al.*, 2007). En otro estudio donde se evaluó la relación de la excitabilidad GABAérgica y los eventos epileptogénicos en un modelo de epilepsia del lóbulo temporal, se encontró que la expresión de KCC2 disminuyó después de 5 días de inducir al estado epiléptico con pilocarpina, demostrando que la regulación a la baja de KCC2 contribuye en la homeostasis del cloruro y en consiguiente a la excitabilidad GABAérgica, teniendo implicaciones importantes para la generación y propensión a convulsiones recurrentes espontáneas (Kourdougli *et al.*, 2017).

Actualmente se ha demostrado que KCC2 está fosforilado en Thr906/Thr1007 en neuronas inmaduras en comparación con neuronas maduras y que este cotransportador forma un complejo físico con WNK-SPAK/OSR1 (De los Heros, 2014; Alessi *et al.*, 2014). Por este lado, se sugiere que un aumento posnatal de la fosforilación regulada por WNKs de KCC2 contribuye sobre la actividad de KCC2 en neuronas patológicas, por lo tanto, a un cambio de GABA de inhibidor a excitador (Kahle & Delpire, 2016; Ben-Ari, *et al.*, 2017, Moore *et al.*, 2017). Otro estudio mostró que una regulación rápida de KCC2 en el tráfico de la membrana

y la función del transporte dependen de la inhibición de GABA_A R. Además, los iones de Cl⁻ pueden actuar como segundos mensajeros intracelulares en las neuronas para modular la fosforilación de KCC2 a través de la vía de señalización de WNKs-SPAK/OSR1. De acuerdo con el papel clave de regulación de la neurotransmisión inhibitoria o excitatoria y en consiguiente las alteraciones de la expresión y la función de KCC2 dependientes de la fosforilación mediada por WNKs-SPAK/OSR1 se han correlacionado con la actividad de la red patológica en una variedad de trastorno neurológicos tal como la epilepsia (Heubl *et al.*, 2017).

8.2 Regulación de la actividad del cotransportador Cation-Cloruro Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Isoforma 1 (NKCC1) en la epilepsia

Los cotransportadores Na⁺-K⁺-2Cl⁻ o NKCCs son proteínas de membrana que utilizan la energía del gradiente de Na⁺ generado por Na⁺/K⁺ ATPasa para acumular Cl⁻ intracelular. Están codificados por los genes SLC12A2 para la isoforma basolateral NKCC1 localizado en el cromosoma 5q23.3 y abarca una longitud aproximada de 105,898 pb. El gen que codifica para la isoforma apical NKCC2 es SLC12A1 se localiza en el cromosoma 15 y abarca una longitud aproximada de 68,205 pb. Aunque su expresión de esta familia es ubicua, durante el desarrollo la expresión de NKCC1 neuronal es alta en las células precursoras neuronales y durante el desarrollo temprano del cerebro teniendo implicaciones importantes en la excitabilidad neuronal. Además, regulan el volumen celular en situaciones en que la célula se enfrenta a cambios en la osmolaridad (Gamba, 2005; Arroyo *et al.*, 2013).

El NKCC1 tiene una región central hidrofóbica flanqueada por dos regiones hidrofílicas en las que se ubican los extremos amino y carboxilo-terminal y tiene varios sitios de fosforilación (Gamba, 2005).

El cotransportador NKCC1 se expresa cuando la concentración del Cl^- intracelular es baja, requiere estar fosforilado para su activación. Regula la concentración intracelular de cloruro al alza en el SNC en neuronas y glía, ya que permite el flujo del Cl^- hacia el interior de la célula. Cuanto mayor sea la actividad del NKCC1, mayor será la $[\text{Cl}^-]_i$ de la neurona. El gradiente de cloruro que crea el NKCC1 produce la despolarización de la membrana celular promoviendo que GABA actúe como estímulo excitador. Sin embargo, si NKCC1 se encuentra inactivo, la concentración intra-neuronal de cloruro disminuye, lo que produce una hiperpolarización de la membrana y de forma contraria GABA actúa como estímulo inhibitorio (Dzhala *et al.*, 2005).

La actividad de este cotransportador es importante para mantener la neurotransmisión GABAérgica. Estudios han relacionado que la expresión al alza del cotransportador NKCC1 promueve el establecimiento de convulsiones crónicas asociada a la despolarización mediada por GABA_A R, ya que al inhibir NKCC1 con bumetanida en un modelo de epilepsia del lóbulo temporal inducida por pilocarpina, generó una acción inhibitoria específica sobre este cotransportador resultando en los efectos asociados con el deterioro de la despolarización mediana por GABA_A R (Dzhala *et al.*, 2005). Además, NKCC1 juega un papel clave en la facilitación de la actividad epileptiforme sináptica en el giro dentado (Nogueira *et al.*, 2015). Por esta razón, la expresión de NKCC1 está asociada a la fuerte excitabilidad neuronal en neuronas inmaduras y neuronas patológicas que inducen la actividad epiléptica (Figura 5) (Dzhala *et al.*, 2005; Ben-Ari *et al.*, 2007; Kourdougli *et al.*, 2017).

Al igual que KCC2, NKCC1 es activado por la vía WNKs-SPAK/OSR1 mediante su fosforilación en tres residuos de treonina. Se ha demostrado que la activación de WNK3 mejora la fosforilación de NKCC1 y conduce a su expresión (Kahle *et al.*, 2006).

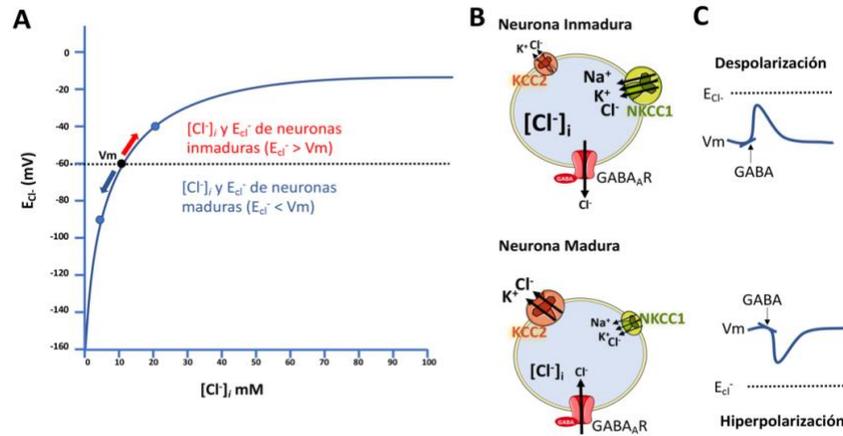


Figura 5 Respuesta de la estimulación de GABA en neuronas mediada por la actividad de NKCC1 y KCC2.

Respuesta de la estimulación de GABA en neuronas mediada por la actividad de NKCC1 y KCC2. A) Muestra como el E_{Cl^-} se ve afectado por los cambios de la $[Cl^-]_i$ de acuerdo con la ecuación de Nernst. B y C) Durante las primeras etapas del desarrollo y en neuronas patológicas (posiblemente en epilepsia), la baja expresión del cotransportador KCC2 y la sobreexpresión de NKCC1, hace que los niveles de la $[Cl^-]_i$ sean elevados por lo que la apertura del canal del receptor de GABA_A permite que los iones Cl^- salgan al espacio extracelular y se produzca una despolarización de la membrana y por lo tanto un efecto excitador del GABA. Por lo contrario, en neuronas adultas existe una elevada expresión de KCC2 y baja de NKCC1, que mantienen una $[Cl^-]_i$ baja, por lo que la apertura del canal del receptor GABA_A hace que fluya hacia el interior de la célula iones de Cl^- , dando lugar a la hiperpolarización de la membrana neuronal y por tanto a un efecto inhibitor del GABA. Modificado de Murillo *et al.*, 2020.

8.3 Regulación de la actividad y expresión de NKCC1 y KCC2 mediante su fosforilación por la vía WNK-SPAK/OSR1-CCC

Los mecanismos de regulación y sensores de la concentración de cloruro intracelular están mediados por los cotransportadores catión-cloruro y su serina/treonina cinasa libre de lisina(K) (WNK), cinasa rica en prolina/alanina relacionada con Ste20/SPS1 (SPAK) y cinasa sensible al estrés oxidativo-1 (OSR1) (Huang *et al.*, 2019). Se ha descrito el papel crítico de las WNK, junto con el complejo ligasa de ubiquitina (CUL3/KLHL3) reguladores cascada arriba y el complejo SPAK/OSR1 reguladores cascada abajo y la familia de los cotransportadores CCC en la fisiología humana y en enfermedades neuronales (Kahle *et al.*, 2010; Alessi *et al.*, 2014; Shekarabi *et al.*, 2017; Solomon *et al.*, 2021).

Las cinasas WNK son conocidas como los “reguladores maestros” de los CCC, (Shekarabi *et al.*, 2017). Pertenecen a la familia de cinasas de serina/treonina que regulan el transporte de iones, en el genoma humano existen 4 genes que codifican para 4 diferentes WNKs: WNK1 en el cromosoma 12, WNK2 en el cromosoma 9, WNK3 en el cromosoma X y WNK4 en el cromosoma 17; se expresan en la mayoría de los órganos (Kahle *et al.*, 2010). Todas las isoformas de WNK poseen un dominio catalítico de cinasa N-terminal, seguido de una región auto inhibidora, que suprime la actividad de la cinasa basal y son activadas por autofosforilación en respuesta a condiciones hiperosmóticas o hipotónicas de contenido de cloruro. Las WNKs son asociadas con sustratos y otras proteínas a través de sus dominios carboxilos terminales (CCT) que interactúan con afinidad similar en los motivos RFXV/I (Arg-The-Xaa-Val/Ile) del dominio cinasa (Thastrup *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2018). Los sustratos WNK mejor caracterizados comprenden a la cinasa SPAK y la cinasa OSR1. Estos sustratos también son sensibles a los cambios de concentración de Cl⁻ y son

activados después de su fosforilación en el bucle T del dominio catalítico de SPAK por WNK1 o WNK4 (Huang *et al.*, 2019).

La cinasa WNK1 funciona como un sensor de la concentración de cloruro, regulado mediante su fosforilación generada por la unión de este anión directamente en la cadena principal. Los residuos Gly370 y Leu371, forman un extremo N-terminal de una hélice corta 3/10, que abarca los residuos Gly370-Lys375. Esta hélice se encuentra en el extremo N del bucle de activación y continua desde la secuencia DLG (subdominio VII), proporcionando una base para la posición única de la lisina catalítica. La hélice 3/10 contribuye a la configuración inactiva observada en la molécula desfosforilada. El ión cloruro forma interacciones hidrófobas con los siguientes residuos: Phe283 en β 3, Leu299 en β 4, Leu369 en la secuencia DLG y Leu 371 en la hélice3/10. Cuando el cloruro se une al sitio activo estabiliza la conformación inactiva de WNK1, previniendo la auto fosforilación y activación de la cinasa en $[Cl^-]_i$ altas. Cuando la $[Cl^-]_i$ es baja, se estimula la fosforilación y activación de WNK1 y se activa (Piala *et al.*, 2014). En un estudio realizado por Bazúa y colaboradores (2015) se demostró que la cinasa WNK4 es sensible al cloruro y que de forma similar a la WNK1 se activa en $[Cl^-]_i$ bajas y se inactiva cuando la $[Cl^-]_i$ es alta (Bazúa *et al.*, 2015). Por lo tanto, las WNK1 y 4 son moléculas que detectan y responden a los cambios de la $[Cl^-]$. Además, tienen una gran especificidad en su expresión en el SNC (incluida a la médula espinal de la asta dorsal) se sugiere que la regulación del cloruro mediada por la vía WNK-SPAK/OSR1-CCC tiene implicaciones importantes en neuronas centrales y periféricas que ayudan a la determinación de la polaridad de la neurotransmisión GABAérgica (Kahle *et al.*, 2010; Shekarabi *et al.*, 2017).

La capacidad de respuesta de los cotransportadores NKCC1 y KCC2 a los cambios en el cloruro extracelular es modulada por procesos de fosforilación/desfosforilación regulados por cinasas sensibles al cloruro (Alessi et al., 2014; Piali *et al.*, 2014). Cuando las condiciones son hipertónicas, las isoformas de WNK1 y WNK4 se auto fosforilan y activan en respuesta al estrés osmótico y a los niveles bajos de la $[Cl^-]_i$; posteriormente interactúan y fosforilan a las cinasas SPAK/OSR1 en los residuos T y S (Thr²³³ Ser³⁷³ SPAK humano) y son activadas. Una vez que se activa SPAK/OSR1 interactúan por medio del CCT RFXV/I y fosforilan en los sitios Thr²⁰³/Thr²⁰⁷/Thr²¹² a NKCC1 y es activado. Simultáneamente SPAK/OSR1 fosforila en los sitios Thr⁹⁰⁶/Thr¹⁰⁰⁷ a KCC2 (en particular fosforilan en los sitios Thr⁹⁹¹/Thr¹⁰⁴⁸ para KCC3 que son homólogos a los sitios de KCC2, estos sitios se conservan en todas las isoformas de KCC en humanos) y lo inhibe por un mecanismo regulador recíproco, lo que permite la movilización de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ hacia el interior de la célula. Por el contrario, en condiciones de hipotonicidad las isoformas de WNK1 y 4 se desfosforilan e inactivan, de tal forma que NKCC1 es desfosforilado, se inhibe y disminuye su expresión; KCC2 es desfosforilado, se sobreexpresa y activa permitiendo la movilización de K⁺ y Cl⁻ al exterior de la célula lo que conduce a una disminución de la $[Cl^-]_i$

De esta forma cuando las WNKs en condiciones de $[Cl^-]_i$ baja se fosforilan y activan a NKCC1 e inhiben a KCC2 permite la entrada de cloruro y el GABA_AR se activa y genera el influjo del cloruro que conduce a la polarización de la membrana y a la excitación neuronal (Shekarabi *et al.*, 2017). La evidencia ha demostrado que la modulación experimental de la fosforilación/desfosforilación de KCC2 mediante las cinasas sensibles a Cl⁻ (WNKs-SPAK/OSR1) altera considerablemente la magnitud de la actividad de KCC2 dependiendo de los sitios donde sea manipulado. La vía WNKs-SPAK/OSR1 es el mecanismo más potente

de estimulación de KCC2 conocido hasta la fecha, y es suficiente para desencadenar respuestas hiperpolarizantes de GABA_A.

Por ejemplo, se ha observado en modelos de convulsiones en ratones que al favorecer la fosforilación en Ser 940 estimula la actividad de KCC2 al aumentar su expresión en la membrana plasmática y por consiguiente se disminuye la actividad epiléptica (Silayeva *et al.*, 2015; Kahle & Delpire, 2016). Por otro lado, se mostró que la desfosforilación dual de KCC2 en Thr906 y Thr 1007 activa de forma potente KCC2 y esta actividad mejorada en las neuronas alcanza valores altos, de modo que se pueden obtener respuestas de GABA_A hiperpolarizantes en neuronas. Esta propiedad es interesante ya que sugiere que los mecanismos de desfosforilación mediados por WNKs-SPAK/OSR1 en presencia de altas concentraciones de [K⁺]_o, favorece la descarga epiléptica, permitiendo que las neuronas ajusten las respuestas inhibitoras de GABA dependientes de Cl⁻ (Figura 6) (Alessi *et al.*, 2014; Watanabe & Fukuda, 2015; Kahle & Delpire; 2016; Huang *et al.*, 2019; Solomon *et al.*, 2021). Estos hallazgos enfatizan aún más la importancia de la vía de WNK-SPAK/OSR1 como una de las principales vías involucradas en la regulación de la [Cl⁻]_i y la funcionalidad de NKCC1 y KCC2, cotransportadores que regulan la señalización GABAérgica.

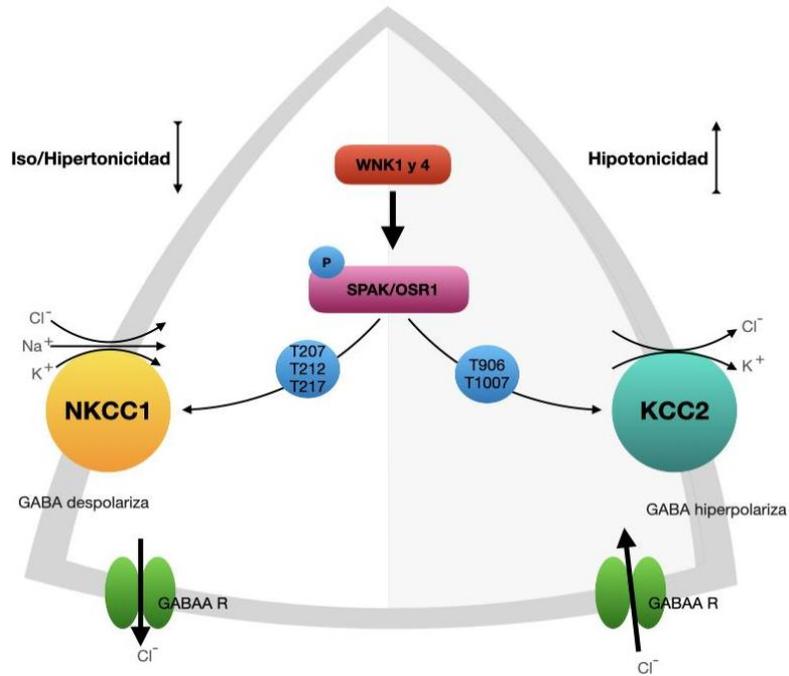


Figura 6 Vía WNK-SPAK/OSR1-CCC.

Vía WNK-SPAK/OSR1-CCC. Este complejo está compuesto por WNK (Sin lisina) y SPAK (quinasa rica en prolina/alanina relacionada con SPS1)/OSR1 (quinasa 1 sensible al estrés oxidativo) y cotransportadores catión-cloruro. La familia WNK detecta cambios en la concentración intracelular del Cl^- , posteriormente estimula a SPAK/OSR1 que fosforilan y estimulan directamente a los CCC (Alessi *et al.*, 2014). Modificada de Liu *et al.*, 2020.

9 Epileptogénesis

El proceso comúnmente conocido como epileptogénesis se refiere al mecanismo por el cual las neuronas principales generan las primeras descargas espontáneas. Estos procesos patológicos continuos y progresivos alteran de forma estructural y funcional los circuitos neuronales conduciendo a que se incremente su excitabilidad y, en consecuencia, su susceptibilidad para presentar actividad epiléptica recurrente hasta lograr el establecimiento de esta enfermedad (Pitkänen *et al.*, 2015; Kasahara *et al.*, 2018). En los seres humanos, la aparición de un traumatismo craneoencefálico grave, convulsiones febriles prolongadas, accidentes cerebrovasculares o un estado epiléptico pueden preceder a la aparición de convulsiones espontáneas. El estado epiléptico (SE) provoca cambios en la expresión de los cotransportadores catión-cloruro KCC2 y NKCC1 lo que da como resultado la acumulación de cloruro intracelular y la reaparición de respuestas inmaduras y despolarizantes del receptor GABA_A que contribuyen a la hiperexcitabilidad neuronal subyacente de la epileptogénesis. El déficit de la neurotransmisión GABAérgica y el aumento de la excitabilidad neuronal detectados durante la fase temprana de la epileptogénesis parece resultar, al menos en parte a la falta de receptores GABA_A funcionales y a concentraciones elevadas de Cl⁻ intracelular (Brandt *et al.*, 2010; González, 2016; Márquez, 2020). Por lo tanto, cambios menores en la homeostasis de la [Cl⁻]_i neuronal puede afectar significativamente la fuerza y la polaridad (excitatoria o inhibitoria) de los efectos de la neurotransmisión de GABA, una disminución transitoria del impulso GABAérgico coincide con la aparición de convulsiones espontáneas. Parece ser que el papel crítico de NKCC1 y KCC2 en el establecimiento de la [Cl⁻]_i neuronal conduce a el desarrollo de la epilepsia cuando se altera el funcionamiento de la neurotransmisión GABAérgica mediada por la expresión de los CCC o por la vía WNK-

SPAK/OSR1-CCC ya que los cambios de la regulación del Cl^- tiene implicaciones importantes en el desarrollo de enfermedades neurológicas (Schulte *et al.*, 2018). El fenotipo electrofisiológico expresado en estudios genéticos preclínicos ha mostrado resultados donde la delección de NKCC1, KCC2 o la inhibición de WNK-SPAK-OSR1 es similar al que se presenta en la epilepsia ya que en ausencia de KCC2 el fenotipo generalmente es la propensión a convulsiones espontáneas (Brandt *et al.*, 2010; Kahle & Delpire, 2016; Di Cristo *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021). Todavía no está claro como un evento epileptiforme recluta circuitos en el hipocampo, giro dentado, la corteza entorrinal y la corteza prefrontal (especialmente la corteza orbitofrontal), y generaliza la lateralidad de las convulsiones. Lo más probable es que la propagación de la actividad epiléptica esté influenciada por múltiples mecanismos celulares y de red asociados con la homeostasis neuronal de $[Cl^-]_i$ en lugar de un solo mecanismo (Kahle & Delpire, 2016; Khateb *et al.*, 2021).

10 Modelos genéticos en animales y mutaciones humanas de NKCC1 y KCC2 asociadas con la epilepsia

La mayor parte de los casos de epilepsia refractaria se consideran fundamentalmente de origen genético, incluyendo casos de herencia monogénica mendeliana (un 2-8% del total) (Kahle *et al.*, 2014). Los modelos experimentales de convulsiones provocadas han ayudado a la identificación de tratamientos anticonvulsivos clínicamente útiles. Sin embargo, estos modelos no recapitulan la patología subyacente asociada con epilepsias genéticas dejando una brecha para el entendimiento de este padecimiento, ya que no modelan la epilepsia en sí (convulsiones espontáneas no provocadas). Además, los programas de descubrimiento de fármacos antiepilépticos no incorporan modelos de epilepsia genética, y esto representa un

problema para pacientes con epilepsia refractaria. Por lo tanto, vale la pena considerar modelos genéticos para el descubrimiento de fármacos antiepilépticos (FAE) (Griffin *et al.*, 2016, 2018).

Actualmente se han identificado genes asociados con la epilepsia, la detección de estas mutaciones genéticas en canales iónicos, proteínas de vesículas sinápticas, receptores, transportadores de neurotransmisores y proteínas involucradas en diversas vías metabólicas nos ha permitido comprender la compleja fisiopatología de la epilepsia (Griffin *et al.*, 2018). Diferentes estudios preclínicos sugieren que la correlación de la baja expresión de KCC2 y el potencial de reversión de GABA (E_{GABA}) están implicados en la epilepsia y la regulación positiva de KCC2 al dirigirse a dominios reguladores críticos puede aprovecharse para suprimir la actividad epiléptica (Woo *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2018). La interrupción de la expresión KCC2 o NKCC1 revela un papel esencial en la homeostasis del cloruro y la excitabilidad neuronal en estados fisiológicos y epileptogénicos.

10.1 Modelos genéticos, disfunción de KCC2 o NKCC1 en la epilepsia.

El uso de modelos animales para el estudio de la epilepsia es esencial para el avance de nuestra comprensión de los mecanismos básicos subyacentes, además de ser fundamentales en el descubrimiento y desarrollo preclínico de nuevos FAE (Löscher, 2011), ya que la epileptogénesis e ictogénesis no puede replicarse en ensayos humanos por razones éticas. La similitud morfológica y fisiológica de las ratas y los ratones a la de los humanos ha facilitado comprender un poco más de los mecanismos por los cuales puede generarse esta enfermedad. Existen diferentes ensayos en los cuales utilizan modelos genéticos para la comprensión de este padecimiento, entre ellos se encuentran los ensayos donde la pérdida genética de NKCC1 y KCC2; o la inhibición de la fosforilación de estos cotransportadores mediante la vía WNK-

SPAK/OSR1, donde se eleva o disminuye la $[Cl^-]_i$ neuronal, se despolariza o hiperpolariza el potencial de equilibrio de GABA y genera inhibición o excitación neuronal, respectivamente (Kahle & Delpire, 2016; Johan *et al.*, 2018).

Estos estudios han proporcionado datos importantes acerca de la influencia genética que puede subyacer tanto al trastorno convulsivo como a las comorbilidades asociadas a la epilepsia (*Tabla 1*) (Chakraborti *et al.*, 2019). Por ejemplo, en los ratones $KCC2^{-/-}$ que carecen de las isoformas $KCC2a$ y $KCC2b$ se reportó un fenotipo con déficits motores que provocaron insuficiencia respiratoria y causaron su muerte al nacimiento (Hübner *et al.*, 2001). Posteriormente Khalilov y colaboradores (2011) usaron los ratones heterocigotos $KCC2^{-/-}$, caracterizados previamente en Hübner *et al.*, 2011, y que en este caso se expresa en sólo un alelo de $KCC2$; ellos observaron que en la etapa temprana E18.5 donde se cree que $KCC2$ no es funcional en el hipocampo y que hay una densidad de sinapsis aumentada y una frecuencia más alta y con más picos de corrientes postsinápticas glutamatérgicas y GABAérgicas espontáneas (potenciales despolarizantes gigantes) con respecto al Wild Type (WT), lo que genera actividades epileptiformes espontáneas y evocadas. También se observó en los ratones $KCC2b^{-/-}$ (la isoforma más abundante en el sistema nervioso) la presencia de convulsiones generalizadas que provocan su muerte en la tercera semana después de nacer (entre los días 12-17 postnatal). Al silenciar este gen se reportó una hiperexcitabilidad en el CA1 del hipocampo en ratones demostrando que la reducción de la expresión de $KCC2$ provoca una alta susceptibilidad a la actividad de convulsiones epilépticas. Por lo contrario, en ratones $KCC2b^{+/-}$ muestran una expresión reducida de $KCC2$ y los individuos pueden llegar a la edad adulta, aunque son propensos a sufrir ataques epilépticos (Woo *et al.*, 2002).

En los ratones knock-in $KCC2^{S940A}$ donde la Serina 949 se sustituyó por una alanina (S949A) se observó que un estado epiléptico inducido por kainato provocó la letalidad dentro

de los 30 min posteriores a la inyección del fármaco y la entrada posterior en SE, sugiriendo que la S940 juega un papel crítico en la potenciación de la actividad de KCC2 para limitar el desarrollo de SE (Silayeva *et al.*, 2015). Además, los estudios realizados en ratones Knock-in KCC2^{T906A/T1007A} donde se previene genéticamente la inactivación fosfo-dependiente, lo que genera una extrusión mayor del Cl⁻ y una reducción significativa de las convulsiones epilépticas inducidas por el Kainato, sugieren la importancia del aumento de la expresión de KCC2 en las neuronas atenúa la actividad epiléptica (Moore *et al.*, 2018). Modelos genéticos con disfunción en el cotransportador KCC2. Modificado de Murillo *et al.*, 2020.

Tabla 1 Modelos genéticos con disfunción en el cotransportador KCC2. Modificado de Murillo *et al.*, 2020.

Modelo murino	Mutación	Efecto de expresión o función de la proteína	Fenotipo	Referencias
KCC2 -/-	Eliminación del exón 5	Ausencia completa de expresión de KCC2	Muerte neonatal debida a la inhabilidad para respirar, severo déficit motor, actividad neuro motora anormal debido a la respuesta excitadora a GABA.	Hubner <i>et al.</i> , 2001.
KCC2b -/-	Eliminación del exón 1	Ausencia de expresión KCC2b, pero no de KCC2a	Muerte de 12-17 días después del nacimiento. Postura anormal (extremidades rígidas), convulsiones generalizadas frecuentes que conducen a una lesión cerebral. Hiperexcitabilidad neuronal (medida en neuronas piramidales CA1 del hipocampo)	Woo <i>et al.</i> , 2002.
KCC2b-/-	Eliminación del exón 1 heterocigoto	Expresión disminuida de isoforma KCC2b	Incremento de la susceptibilidad al proconvulsivo pentiltenetrazol, convulsiones esporádicas en ratones viejos.	Woo <i>et al.</i> , 2002.
KCC2 E/E	Mutación por Fosfomimetización T906E/T1007E, Homocigota	Actividad disminuida de KCC2	Muerte neonatal debida a la inhabilidad para respirar. En ratones nacidos por cesárea en E18.5: convulsiones generalizadas espontáneas y provocadas por el tacto. Distribución neuronal anormal. Baja frecuencia del ritmo locomotor medido en raíces ventrales de 2a lumbar.	Watanabe <i>et al.</i> , 2019.
KCC2 A/A	Mutación por Fosfoablación T906A/T1007, homocigoto	Actividad incrementada de KCC2	Sobreviven hasta la edad adulta sin otros fenotipos. Morfología normal del cerebro y excitabilidad normal. El equilibrio de GABA tiende a lo negativo en neuronas del hipocampo. Tienen retraso en el desarrollo de convulsiones inducidas por Kainato y disminución en la tasa de mortalidad den estado epiléptico.	Moore <i>et al.</i> , 2018.
KCC2 S940A/S940A	Mutación por fosfoablación S940A	Sin efecto en actividad basal de KCC2 en neuronas del hipocampo pero decremento de actividad KCC2 en neuronas estimuladas por glutamato	Llegan a la edad adulta sin otros fenotipos. Tienen aumento a la sencillez de Kainato: presentando un inicio acelerado del estado epiléptico. Así como mayor severidad convulsiva.	Silayeva <i>et al.</i> , 2015.

En ratones con fenotipo NKCC1^{-/-} se demostró que al silenciar este gen no se producían cambios en la actividad interictal epileptiforme inducida por baños de 8.5mM de [K⁺], pero en la camada silvestre que fue tratada con bumetanida si hubo un cambio significativo ya que al producir convulsiones y al aplicar este fármaco se generó una reducción de esta actividad convulsiva. Indicando que el uso del diurético bumetanida tiene efecto sobre la actividad epiléptica (Dzhala *et al.*, 2005). Posteriormente Pfeffer y colaboradores (2009), observaron que en ratones NKCC1^{-/-} la disminución de la excitación GABAérgica dio como resultado, una actividad de red espontánea reducida, además de un retraso en la maduración de la sinapsis glutamatérgica y GABAérgica. Simultáneamente se observó que los ratones NKCC1^{-/-} tienen un fuerte aumento compensatorio en la excitabilidad intrínseca de las neuronas glutamatérgicas en ausencia de la señalización GABAérgica (Sipilä *et al.*, 2009). Por el contrario, se realizó otro experimento con los ratones NKCC1^{-/-} a los que se les indujo al SE con Kainato y se observó que tanto los ratones silvestres (NKCC1^{+/+}) como los ratones NKCC1^{-/-} presentan datos similares en cuanto a latencia, al inicio del SE y duración SE, pero existe una diferencia en el número de ataques convulsivos generalizados intermitentes durante el estado epiléptico ya que fue mayor en los ratones NKCC1^{-/-} en comparación con los silvestres. Además, la frecuencia de convulsiones electro-clínicas fue mayor en los ratones NKCC1^{-/-} lo que indica una progresión facilitada de convulsiones electro-clínicas durante la epilepsia crónica y un fenotipo más grave, en ausencia de NKCC1. Estos hallazgos sugieren que el NKCC1 es prescindible para la inducción, progresión y manifestación de la epilepsia y no apoyan la noción de que al inhibir NKCC1 en el cerebro sea útil para prevenir o modificar la epilepsia (Tabla 2) (Hampel *et al.*, 2021).

Tabla 2 Modelos genéticos con disfunción en el cotransportador NKCC1

Modelo murino	Efecto de expresión o función de la proteína	Fenotipo	Referencias
NKCC1-/-	Ausencia completa de NKCC1	Al inducir baños de [K+]o no producen cambios en la actividad interictal. Pero la camada WT en presencia de bumetanida y convulsiones inducidas tuvo un cambio significativo.	Dzhala <i>et al.</i> , 2005.
NKCC1-/-	Ausencia completa de NKCC1	Presentan una actividad GABAérgica disminuida que dio como resultado una actividad de red espontánea reducida.	Pfeffer <i>et al.</i> , 2009.
NKCC1-/-	Ausencia completa de NKCC1	Presentan un aumento compensatorio de la excitabilidad intrínseca de las neuronas glutamatérgicas en ausencia de señalización GABAérgica.	Pfeffer <i>et al.</i> , 2009 & Sipilä <i>et al.</i> , 2009.
NKCC1-/-	Ausencia completa de NKCC1	En presencia de Kainato presenta una mayor frecuencia a las convulsiones electroclínicas durante la epilepsia crónica y un fenotipo más grave, en ausencia de NKCC1.	Hampel <i>et al.</i> , 2021.

10.2 Mutaciones humanas

Las líneas convergentes de evidencia de la genética humana han asegurado el vínculo entre la disfunción de KCC2 y el desarrollo de la epilepsia (Duy *et al.*, 2019). Dentro de esta evidencia, se han reportado estudios genéticos en humanos en los que se han asociado mutaciones específicas en el cotransportador KCC2 con el desarrollo de la epilepsia. En estos estudios, se observó que mutaciones que producen una alteración y degeneración en el carbono terminal de KCC2 afectan la función del cotransportador, el tráfico y/o la fosforilación regulada por la S940, sugiriendo que el deterioro de la regulación de KCC2 podría ser un factor de riesgo y contribuir a la patogénesis de la epilepsia generalizada idiopática (Kahle *et al.*, 2014). Simultáneamente, se reportó un estudio en una familia australiana que presentaba convulsiones febriles donde se demostró que KCC2-R952H reducía la capacidad de extrusión del cloruro debido a una expresión reducida con respecto a la versión silvestre, demostrando que KCC2-R952H también es una variante de susceptibilidad a las convulsiones febriles y refuerza aún más el vínculo genético entre KCC2

y la epilepsia humana (Puskarjov *et al.*, 2014). En otro estudio realizado en una familia de Japón se enfocaron en el análisis de genes de dos variantes heterocigotas compuestas o variantes homocigotas que eran compatibles con un rasgo autosómico recesivo y encontraron que el gen SLC12A5 estaba alterado en el hijo que estaba afectado con epilepsia migratoria multifocal, él presentaba las variantes c.279+1G>C y c.572c>T (p.A191V) mientras que su hermano que no tenía esta condición sólo presentaba c.279+1G>C. Posteriormente, en este mismo estudio encontraron un paciente malasio con mutaciones heterocigóticas compuestas que el SLC12A5: c.967T>c (p.S323P) y c.1243A>G (p.M415V) y un paciente japonés con mutaciones heterocigóticas compuestas de SLC12A5[c.953>C(p.W318s) y c.2242_2244 del(p.S748del)] a quien se le diagnosticó con epilepsia intratable no clasificada; de igual forma se reportó que hubo un déficit en la extrusión del Cl⁻ (Saito *et al.*, 2016). Por otro lado, en un paciente con epilepsia de la infancia con convulsiones focales migratorias (EIMFS) reveló que tenía una mutación sin sentido (p.L311H), dos mutaciones heterocigotas compuestas con mutaciones sin sentido (p.[L426P(;) G551D] y p. [S323P(;) M415V]) y dos mutaciones heterocigotas compuestas sin sentido y mutaciones de delección en marco (p. [E50_Q93 del (;) A191V] y p. [W318(;) S248del]) identificadas en SLC12A5 heredadas del padre (Saito *et al.*, 2017). El estudio más reciente ha identificado una nueva mutación heterocigota de una variante de KCC2 sin sentido (V4731) donde el fenotipo de un paciente húngaro subraya un diagnóstico de epilepsia generalizada idiopática tipo 14 (*Tabla 3*) (Till *et al.*, 2019).

Tabla 3 Modelos genéticos en humanos con disfunción en el cotransportador KCC2. Modificada de Duy et al., 2019.

Exon	NT intercambio	AA intercambio	Tipo	Legado	Fenotipo	Etnia	Referencia
21	c.2855G>A	p.R952H	Sin sentido	AD	IGE; Convulsiones Febriles	Franco-canadiense; australiano	Kahle et al., 2014; Puskarjov et al., 2014.
23	c.3145C>T	p.R1049C	Sin sentido	AD	IGE	Franco-canadiense	Kahle et al., 2014.
9	c.1277T>C	p.L426P	Sin sentido	AR, compuesto heterocigoto	EIMFS	Sueco	Stöðberg et al., 2015.
13	c.1625G>A	p.G551D	Sin sentido				
8	c.932T>A	p.L331H	Sin sentido	AR, homocigoto	EIMFS	Pakistani	Stöðberg et al., 2015
3	c.279 + 1G>C	p.E50_Q93del	Delección	AR, compuesto heterocigoto	EIMFS	Japonés	Saitu et al., 2016.
6	c.572C>T	p.A191V	Sin sentido				
8	c.967T>C	p.S323P	Sin sentido	AR, compuesto heterocigoto	EIMFS	Malasio	Saitu et al., 2016.
10	c.1243A>G	p.M415V	Sin sentido				
8	c.953G>C	p.W318S	Delección	AR, compuesto heterocigoto	EIMFS	Japonés	Saitu et al., 2016.
18	c.2242_2244del	p.S748del	Sin sentido				
9	c.1196CT	p.S399L	Sin sentido	AR, compuesto heterocigoto	EIMFS	Japonés	Saito et al., 2017.
20	c.2639G>T	p.R880L	Sin sentido				
11	c.1417G>A	p.V473I	Sin sentido	AD	IGE	Húngaro	Till et al., 2019.

AA, amino ácido; AD, Autosoma dominate; AR, autosoma recesivo; EIMFS, epilepsia de infancia con migración de convulsiones focales; IGE, epilepsia generalizada idiopática; NT, nucleotido.

10.3 Modelos genéticos de no mamíferos

La revisión de modelos no mamíferos de investigación sobre epilepsia (es decir, pez cebra, *Drosophila*, *C. elegans*, entre otros.) describe la importancia de estos modelos para comprender mejor los mecanismos de la epileptogénesis, así como para detectar nuevos compuestos con posibles propiedades anticonvulsivas (Chakraborti et al., 2019). La ventaja de estos modelos es que incluyen una mayor rentabilidad, una alta correlación genética con los humanos y una reproducción rápida (Johan et al., 2018). Por ejemplo, en el modelo del Pez cebra se generaron peces con el fenotipo doble knock-out $KCC2a^{-/-}KCC2b^{-/-}$ donde se evaluó el comportamiento motor inducido por tacto, se observó que, en contraste con el silvestre, el knock-out mostró movimientos anormales espasmódicos durante la respuesta de escape (Stöðberg et al., 2015).

En un modelo de *C. elegans* donde se evaluó el efecto de KCC2 y ABTS-1 sobre la actividad GABAérgica, se observó que el doble mutante *abts-1;kcc-2* desarrolla efectos graves en la longitud del cuerpo, músculos hipercontraídos y locomoción descoordinada atribuibles al menos en parte a la falta de la señalización inhibitoria del GABA. Además, los mutantes simples *kcc-2* y *abts-1* por separado tienen defectos en la extrusión del cloruro indicando que defectos en la plasticidad del cloruro afecta la señalización GABAérgica sobre excitando a las neuronas (Bellemer *et al.*, 2011).

Por otra parte, en moscas *Drosophila melanogaster* con una mutación del alelo *kcc^{DHS1}* (forma funcional homóloga a la de los humanos) con niveles reducidos de KCC, se observó un fenotipo conductual paralítico. Además, de tener una susceptibilidad a convulsiones epilépticas en moscas jóvenes de una forma similar, lo observado en ratones concentraciones reducidas de KCC2, estos datos contrastan con la idea de que cuando se encuentra reducida la actividad KCC2, la plasticidad del cloruro neuronal tiende a altas concentraciones dando como resultado que se desarrollen de crisis epilépticas ocasionadas por una alta señalización excitadora GABAérgica (Hekmat *et al.*, 2010).

11 Tratamientos para la epilepsia

El principal objetivo en el tratamiento de los pacientes con epilepsia es conseguir un adecuado control de las crisis epilépticas, y así mejorar su calidad de vida y evitar el deterioro, la exclusión y estigmatización asociados a la presencia de crisis epilépticas frecuentes y mantenidas a lo largo de los años. Desde el punto de vista fisiopatológico es de gran interés el estudio de la propagación de eventos epileptiformes y cómo tratarlos, ya que involucran varios mecanismos de reclutamiento de redes neuronales que son afectadas y se propagan generando convulsiones. La importancia clínica de la propagación de las convulsiones se

debe principalmente al hecho de que las manifestaciones epilépticas no pueden atribuirse únicamente a la actividad en el foco convulsivo en sí, sino a la propagación de la actividad epiléptica a otras estructuras cerebrales. Esta propagación tiene gran relevancia ya que representa un riesgo para los pacientes debido a que cuando se extiende causa generaciones secundarias que promueven caídas recurrentes, lesiones traumáticas y mal resultado neurológico. Por esta razón, es importante entender el mecanismo o los mecanismos de generación y propagación de convulsiones durante el estado epiléptico, para poder generar adecuadas estrategias y dianas terapéuticas para el tratamiento de la epilepsia (Khateb *et al.*, 2021). Aunque las estrategias terapéuticas actuales para la epilepsia incluyen fármacos antiepilépticos y tratamientos quirúrgicos que se centran en la supresión de la propagación de convulsiones existentes en lugar de la aparición de la primera convulsión espontánea (Kasahara *et al.*, 2018).

Existen dos tipos de tratamientos empleados para el control de las crisis epilépticas: los tratamientos farmacológicos y no farmacológicos. Los tratamientos farmacológicos son aquellos que tratan los síntomas (frecuencia e intensidad de las crisis) con intervención química, son muy efectivos ya que el 60-70% de los pacientes epilépticos responden a estos fármacos antiepilépticos. Por otro lado, los tratamientos no farmacológicos se definen como cualquier intervención no química, teóricamente sustentada, focalizada y replicable, realizada sobre el paciente con la finalidad de mejorar su calidad de vida. Dentro de estos tratamientos se encuentran las dietas e intervenciones quirúrgicas, entre otros. Cabe mencionar que entre el 5% y 10% de los pacientes epilépticos son candidatos a tratamiento quirúrgico, como la estimulación del nervio vago y la cirugía epiléptica, el resto requiere ser tratado con nuevos fármacos antiepilépticos u otras alternativas a la farmacoterapia

convencional como los esteroides, la inmunoglobulina o la dieta cetogénica, por mencionar algunos (Ruíz *et al.*, 2000; Johan *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2020).

11.1 Tratamientos farmacológicos

Después de años de investigación, los únicos tratamientos actuales, eficaces y aprobados para el tratamiento de los síntomas de la epilepsia se basan en la potenciación de la inhibición sináptica mediada por GABA; inhibición de los canales de iones de Na⁺; reducción del flujo de Ca²⁺; y en la reducción de la actividad glutamatérgica. Dentro de estos FAE se encuentran:

1. Barbitúricos: Funcionan inhibiendo la transmisión monosináptica y polisináptica en el SNC. Aumenta el umbral de estímulo mediante la unión de GABA al GABA_AR.
2. Benzodiazepinas: Funcionan cuando se unen al receptor GABA_A. Modulan la unión de GABA a su receptor, incrementan el efecto inhibitor de GABA y aumentan las frecuencias con las cuales se abren los canales de Cl⁻.
3. Vigabatrina: es un fármaco análogo, actúa sobre la disponibilidad de GABA ya que inhibe de manera irreversible la GABA-amino transminasa (GABA-T) enzima encargada del catabolismo de GABA.

Estos medicamentos afectan el proceso de la propagación de convulsiones de forma variable y con diferentes potencias. Se cree que los FAE suprimen la generación y propagación de convulsiones (Khateb *et al.*, 2021). Dentro de los fármacos de primera generación son caracterizados por utilizar como diana los GABA_AR ya que inducen efectos de sedación, sueño y funcionan como anestésico. Estos fármacos, facilitan la función de los receptores pentaméricos GABA_A que se encuentran en todas las regiones del cerebro. La configuración de los receptores GABA_A permiten la unión del neurotransmisor GABA con especial fijación a las subunidades α y β , donde las benzodiazepinas se unen entre α y γ , los barbitúricos, el

etanol y neuroesteroides se unen a sitios ubicados en la parte transmembranal de las subunidades γ 1-3, ó δ , ϵ , π , θ y ρ 1-3 (Figura 7) (Uusi-Oukari & Korpi, 2010). Uno de los problemas del uso prolongado de fármacos agonistas del GABA es que el paciente genera tolerancia, además de presentar efectos adversos, como mareos, náuseas, fatiga, depresión, problemas de aprendizaje, de memoria y ataxia. Así como su oferta limitada en países con recursos escasos y costos elevados (Perucca & Meador, 2005; Khanna *et al.*, 2013; Chakraborti *et al.*, 2019).

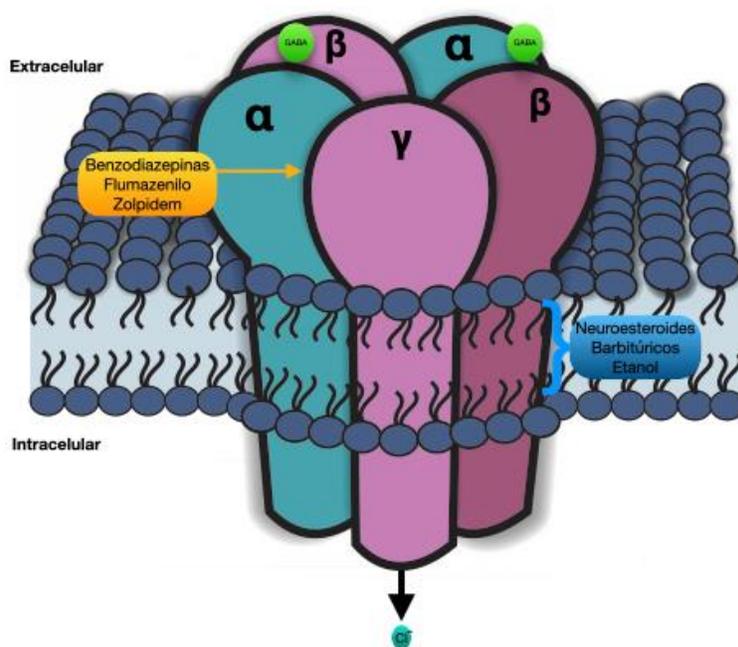


Figura 7 Estructura y sitios de unión del GABA_A R.

El receptor GABA_A es un complejo pentamérico, que se compone de dos subunidades α , y dos subunidades β y una subunidad γ . El sitio de unión del neurotransmisor GABA se sitúa entre las subunidades α y β , las benzodiazepinas, flumazenilo y zolpidem se unen entre α y γ . Los barbitúricos, el etanol y los neuroesteroides se unen a sitios ubicados en la parte transmembranal. Modificado de Uusi-Oukari *et al.*, 2010.

La elección del fármaco o los fármacos para el tratamiento de la epilepsia es empírica y a menudo se basa en ensayo y error. Desde la década de 1980 se han introducido más de 15 FAE, complicando la correcta selección del primer fármaco para el tratamiento óptimo de la epilepsia. Los pacientes que no mejoran con la aplicación del primer fármaco continúan el tratamiento con una monoterapia alternativa (sustituyendo el primer fármaco) o una terapia combinada (se añade un segundo fármaco a la monoterapia actual). Sin embargo, los pacientes que no responden a dos o más fármacos desarrollan refractariedad y tienen que usar tratamientos alternos como dietas y cirugías para el control de sus síntomas (Nevitt *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2020).

11.2 Fármacos antiepilépticos

De acuerdo con Khatep y cols. (2021) los fármacos más utilizados en monoterapia y terapia combinada para el tratamiento de la epilepsia, se enlista de acuerdo con sus mecanismos de acción:

a. Ácido valpórico (VPA)

El VPA se usa ampliamente para todos los tipos de convulsiones. Su mecanismo de acción incluye el aumento de la actividad GABAérgica, la supresión de la neurotransmisión excitadora y la modificación de las monoaminas. Es considerado como un fármaco de primera línea en pacientes con epilepsia generalizada idiopática. Se ha mostrado en estudios *in vivo* que detiene la propagación de los eventos epileptiformes que se inician en CA3a y se propagan de forma bidireccional a CA1 y CA3c. Es contraindicado en mujeres en edad fértil y en pacientes resistentes al VPA.

b. Carbamazepina (CBZ)

El fármaco CBZ es un antiepiléptico de primera generación que actúa principalmente sobre los canales de sodio activados por voltaje en las fases de inactividad abierta y rápida. Son usados para tratar convulsiones focales y tónico-clónicas generalizadas. Es probable que su mecanismo de acción afecte el inicio de las convulsiones y la excitabilidad neuronal y no a la propagación de las convulsiones.

c. Fenitoína (PTH)

La PTH es un fármaco antiepiléptico de primera generación que actúa principalmente sobre los canales de sodio activados por voltaje. Se cree que el efecto anticonvulsivo es más específico al inicio de las crisis convulsivas y su duración en la propagación de las convulsiones.

d. Lamotrigina (LTG)

La LTG es un fármaco antiepiléptico de segunda generación. Se utiliza principalmente para tratar epilepsias focales con o sin generalizaciones secundarias. Su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la actividad de los canales de sodio y calcio dependientes de voltaje. Actúan suprimiendo la propagación de las convulsiones, ya que en gran medida la propagación de las convulsiones depende de las corrientes de calcio activadas por alto voltaje, en consecuencia, al disminuir esas corrientes, se cree que LTG inhibe la propagación y es muy probable que sea mediante la atenuación de la actividad del receptor de AMPA en la circunvalación dentada, lo que logra efectos negativos en la propagación de las convulsiones.

e. Levetiracetam (LEV)

Actualmente se desconoce en gran medida el mecanismo de acción de este fármaco, pero se cree que es mediante la neurotransmisión actuando sobre SV2A, una proteína presináptica. Es utilizado en la mayoría de los tipos de convulsiones, tiene un efecto sobre la propagación de las convulsiones y no en el inicio de la crisis epiléptica. Induce a la inhibición de una actividad sincronizada excesiva entre neuronas sin afectar la excitabilidad neuronal normal. Lo que indica la influencia relativa selectiva de LEV en la propagación de las convulsiones. Además, modula el canal de calcio presináptico dependiente del voltaje de tipo P/Q, lo que reduce la liberación de glutamato en el giro dentado y suprime la actividad hipersincrónica entre neuronas en las áreas CA3 del hipocampo.

f. Lacosamida (LCM)

La LCM consiste en aminoácidos diseñados como un medicamento anticonvulsivo, funciona mediante la inactivación lenta de canales de sodio dependientes de voltaje. La inactivación de los canales de sodio dependientes de voltaje son cruciales para las propiedades de activación y determinación de la excitación neuronal, incluido el umbral de los potenciales de acción, los estallidos del potencial de acción y la retropropagación activa de los potenciales de acción hacia las regiones dendríticas. Este fármaco es eficaz en pacientes con epilepsia focal farmacorresistente. Posee potencias anticonvulsivas y antinociceptivas, contribuye a la supresión de la actividad patológica, sin afectar la actividad neuronal normal.

g. Topiromato (TPM)

Los mecanismos de acción de este fármaco aún no se comprenden completamente, pero se ha demostrado que tiene varios efectos antiepilépticos potenciales. Estos incluyen la inhibición de los receptores postsinápticos AMPA y kainato. Los mecanismos adicionales incluyen el bloqueo de los canales de sodio y calcio activados por voltaje y modulaciones positivas en los receptores GABA_A. Se observó que el TPM actúa tanto sobre el foco epiléptico a través del aumento del umbral de convulsiones focales e inhibiendo la propagación de las convulsiones.

h. Perampanel (PER)

Es un antagonista del receptor AMPA que inhibe la transmisión excitadora suprimiendo las corrientes excitadoras en la membrana postsináptica. Este fármaco no disminuye la actividad epiléptica en el foco, pero reduce la gravedad y la duración de las convulsiones. Tiene una influencia selectiva sobre la inhibición de la propagación de las convulsiones tanto cerca del foco como en la propagación distante.

i. Zonisamida (ZN)

Su eficacia antiepiléptica se demostró principalmente como un agente terapéutico coadyuvante en pacientes con convulsiones focales, bloquea los disparos repetitivos del potencial de acción a través de que actúa sobre los canales de sodio sensibles al voltaje y reduce las corrientes de calcio de tipo T sensibles al voltaje. Al parecer su mecanismo de acción es sobre la propagación de las convulsiones más que la iniciación del foco convulsivo.

j. Benzodiazepinas (BZD) y fenobarbitúricos (PB)

Su mecanismo de acción es mediante la modulación de la actividad GABAérgica, afecta la propagación de las convulsiones. Sin embargo, debido a la posible modulación de la actividad GABAérgica durante la epilepsia crónica, la influencia total es complicada y en ocasiones inesperada.

k. Cannabidiol (CBD)

La función antiepiléptica exacta del sistema endocannabinoide no se ha aclarado por completo. Se cree que la administración de CBD mejora la actividad de las interneuronas inhibitoras en regiones críticas para la propagación de las convulsiones, como en el giro dentado. En ensayos clínicos se ha demostrado que aumenta el umbral de postdescarga, reduciendo así la amplitud, duración y propagación de las postdescargas en ratas con convulsiones límbicas encendidas eléctricamente. Reduce el porcentaje de convulsiones generalizadas graves, lo que indica su efecto negativo selectivo sobre la propagación de la actividad epiléptica.

Generalmente, se cree que los fármacos antiepilépticos suprimen la generación, así como la propagación de la actividad epiléptica pero esta afirmación es relativa ya que cada fármaco tiene procesos diferentes por los cuales suprime esta actividad de esta forma se ve afectada su eficacia. En la tabla 4 se muestran los fármacos antes mencionados organizados según su eficacia (Khatap *et al.*, 2021).

Tabla 4 Relación de la eficacia de algunos fármacos antiepilépticos utilizados en la propagación de la actividad epiléptica. Modificada de Khatep *et al.*, 2021.

Mejor efecto	Efecto intermedio	Menor efecto
Ácido Valpórico	Lamotrigina	Carbamazepina
Levetiracetam	Topiramato	Fenitoína
Perampanel	Barbituricos	Lacosamida
Zonisamida	Benzodiazepinas	
Cannabidiol		

11.3 Tratamientos no farmacológicos

Dieta cetogénica (DC)

Dentro de los tratamientos no farmacológicos para controlar las crisis epilépticas se encuentra la aplicación de dietas tales como la dieta cetogénica (DC). Esta dieta es aplicada en pacientes con epilepsia refractaria y sirve como coadyuvante para el tratamiento de la epilepsia. Consiste en la selección de regímenes alimenticios que aporten un alto contenido en grasas, bajo contenido en hidratos de carbono y aporte adecuado de proteínas (Caraballo & Vining, 2012), su mecanismo de acción es mediante el incremento de cuerpos cetónicos hemáticos permitiendo que el cuerpo entre en un estado de cetosis sistémica, estimulando la síntesis de acetoacetato (AcAc), hidroxibutirato (HB) y acetona a través de la vía hepática 3-hidroxi-3-metilglutarilCoA (Belietti *et al.*, 2010). Se han realizado varios estudios prospectivos no controlados que han demostrado que la DC favorece la reducción sustancial en la frecuencia de las crisis. Además, se posicionó como una alternativa en toda epilepsia resistente siendo de primera elección en condiciones específicas como la deficiencia de GLUT-1 y el déficit de piruvato deshidrogenasa (Ding *et al.*, 2010).

Tratamiento quirúrgico

Este procedimiento consiste en la resección de la zona de epileptogénesis, generalmente la resección se basa en indicadores preoperatorios de patología del hipocampo no invasivos, más que en los hallazgos intraoperatorios intercríticos de la electro-corticografía. Dentro de estas cirugías se encuentra la cirugía de epilepsia temporal medial, resección temporal anteromedial, lesionectomía-corticectomía y la hemisferotomía (Hemisferectomía funcional). El tratamiento quirúrgico se realiza pocas veces ya que no todos los pacientes con epilepsia refractaria son candidatos para que se les realice este procedimiento (Aparicio *et al.*, 2009).

Procedimientos paliativos

Aparicio y cols. (2009) describen diferentes procedimientos paliativos para tratar la epilepsia refractaria, dentro de los cuales se encuentra: la cirugía donde se estimula eléctricamente al nervio vago. Consiste en la implantación de un dispositivo conectado al nervio vago del cuello que posteriormente envía suaves impulsos eléctricos y solo afecta a una zona del cerebro. Es utilizada en pacientes que tienen epilepsia refractaria y que no son elegibles para la cirugía de la epilepsia o en que la cirugía no logró reducir las frecuencias de convulsiones (Panbianco *et al.*, 2015). La Callosotomía es un procedimiento que se utiliza en pacientes que sufren epilepsia secundariamente generalizada que presentan daño cerebral difuso y una elevada frecuencia de crisis atónicas con caídas dropattacks. Consiste en limitar la sección del cuerpo calloso a los dos tercios anteriores de dicha comisura mayor. No es una intervención curativa, pero disminuye o elimina a su totalidad los dropattacks, logrando una mejoría significativa en el 70% de los pacientes intervenidos.

La transición subpial múltiple es un procedimiento paliativo que tiene como objetivo la interrupción quirúrgica de las fibras horizontales intracorticales dentro de la zona epileptógena. Consiste en practicar transacciones subpiales verticales y paralelas, separadas 5 mm entre sí. También encontramos dentro de estos procedimientos, la estimulación cerebral profunda, es un procedimiento donde se realiza una estimulación eléctrica de estructuras subcorticales, como el núcleo centromediano del tálamo, el núcleo subtalámico de Luys o el núcleo anterior del tálamo, su objetivo es reducir la epileptogenicidad cerebral.

12 Discusión y conclusiones

Cada vez se han generado más estudios que revelan el papel fundamental de KCC2 y NKCC1 en la patología de varios síndromes de epilepsia a través de modelos genéticos en animales y en múltiples estudios de tejidos humanos (Löscher, 2011; Kahle *et al.*, 2014; Moore *et al.*, 2017; Schulte *et al.*, 2018). Estos modelos en los que se reduce o elimina la expresión de KCC2 resultan en la disminución de la fuerza impulsora de las corrientes inhibitoras mediadas por GABA, lo que genera una desinhibición significativa y una mayor susceptibilidad a las convulsiones (Woo *et al.*, 2002; Kahle *et al.*, 2014; Kahle & Delpire, 2016). Además, también se han identificado cambios en la sobre-expresión de NKCC1 en varios tipos de epilepsia (Dzhala *et al.*, 2005; Dzhala *et al.* 2010; Ben-Ari *et al.*, 2007; Ben-Ari *et al.*, 2017; Di Cristo *et al.*, 2017). La regulación positiva de KCC2 en células neuronales conduce a la disminución de la $[Cl^-]_i$ y, en consecuencia, un aumento de la magnitud de la respuesta inhibitoria a GABA, esta estimulación se debe a la desfosforilación mediada por la vía WNKs-SPAK/OSR1-CCC (Chamma *et al.*, 2012; Kahle *et al.*, 2014; Murillo *et al.*, 2020).

La activación de las vías WNK-SPAK/OSR1-CCC provoca la fosforilación de los residuos de treonina T906 y T1007, lo que resulta en una disminución de KCC2 y la sobreexpresión de NKCC1 (Liu *et al.*, 2020). Estos cotransportadores son dos miembros importantes de la familia de CCC ya que regulan los efectos de las señales GABAérgicas mediando los gradientes de $[Cl^-]_i$. La actividad sináptica GABAérgica donde la transición de GABA_A, cambia de inhibidor a excitador en neuronas patógenas regresando al fenotipo de neuronas inmaduras donde la $[Cl^-]_i$ es alta y juega un papel fundamental en la epileptogénesis, en general y especialmente en la propagación, generalización y terminación de las

convulsiones (Lee *et al.*, 2005; Ben-Ari *et al.*, 2012; Khateb *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020; Murillo *et al.*, 2020). La función de KCC2 podría mejorarse mediante la inhibición de la cascada arriba de la vía WNK-SPAK/OSR1 facilitando la extrusión de Cl^- y promoviendo la inhibición del ácido γ -aminobutírico (Alessi *et al.*, 2014; Kahle *et al.*, 2014; Kahle & Delpire, 2016). Aunque las cascadas moleculares que conducen a CCC desequilibradas y la posibilidad de progresión de la plasticidad del cloruro patológica siguen siendo en gran parte desconocidas (Liu *et al.*, 2020), se asocia a la desfosforilación de KCC2 en su Ser 940 ya que conduce a un aumento de $[\text{Cl}^-]_i$ y una excitación GABAérgica más fuerte. Sin embargo, se deben de realizar más estudios para explorar la vía WNKs-SPAK/OSR1-CCC en la sinapsis GABAérgica durante los focos epilépticos en los modelos de epilepsia, para definir si este es su mecanismo de acción (Figura 8).

Modelo de la Vía WNK-SPAK/OSR1-CCC en la Epilepsia

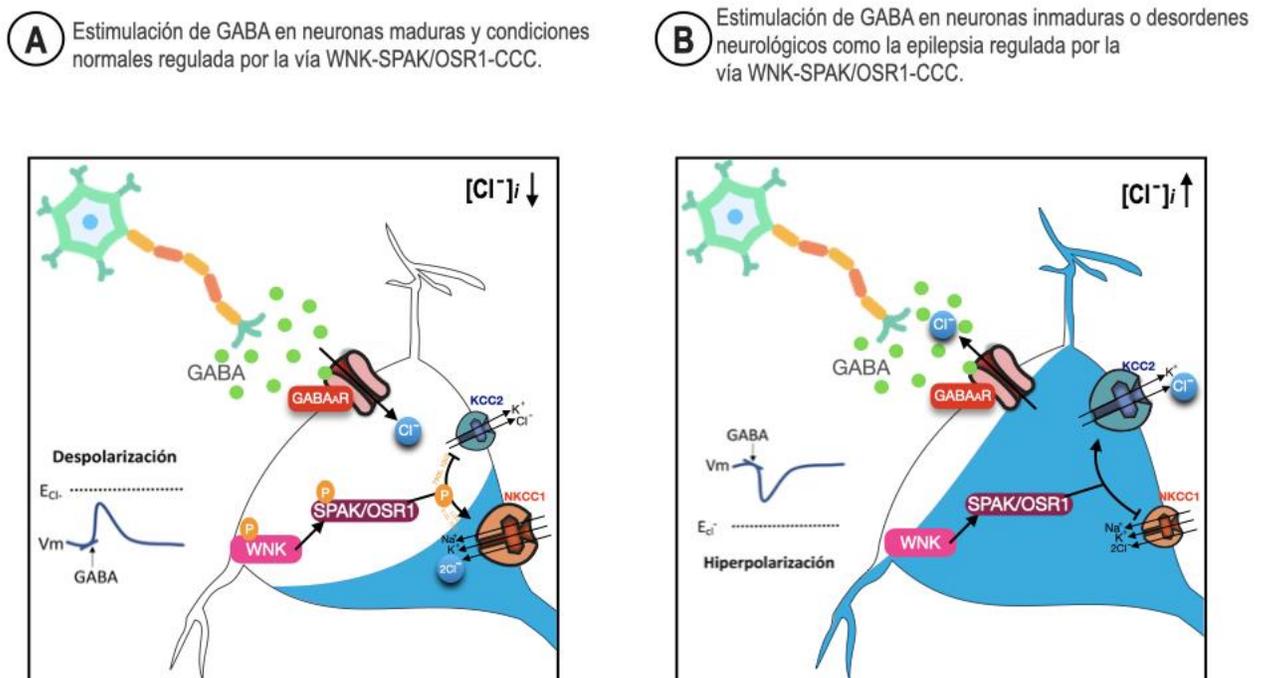


Figura 8 Modelo de la Vía WNK-SPAK/OSR1-CCC en la epilepsia

Las respuestas despolarizantes mediadas por GABA_A se han utilizado por mucho tiempo como diana terapéutica en los FAE. Aunque en muchos pacientes con epilepsia responden bien a este tipo de terapias convencionales, en gran medida estos fármacos resultan ineficaces para controlar la epilepsia neonatal y refractaria (Kasahara *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020). Los mecanismos por los cuales suprimen la propagación de la actividad epiléptica se basan en la inhibición difusa de la transmisión sináptica excitadora de diversas formas, cabe mencionar que algunos FAE parecen tener una influencia selectiva en las regiones del cerebro críticas tales como el hipocampo y la corteza prefrontal (Khateb *et al.*, 2020). A pesar del desarrollo exitoso de nuevos fármacos antiepilépticos en las últimas décadas, la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas con mejor eficacia y tolerabilidad para el control o eliminación de la actividad epiléptica sigue siendo un objetivo importante (Löscher, 2011). Actualmente se han desarrollado moléculas pequeñas inhibitoras de la vía WNK-SPAK/OSR1 ya que las cinasas humanas juegan un papel fundamental en la señalización celular y constituyen una poderosa clase de diana terapéutica (Yamada *et al.*, 2016). Con la creciente evidencia en estudios preclínicos donde se potencializa la activación de KCC2 para el control de convulsiones, probablemente se pueden generar FAE de nueva generación donde su mecanismo de acción sea mediante la modulación farmacológica que comprendería un reóstato molecular de la vía WNK-SPAK/OSR1 para mejorar la extrusión de Cl⁻ y restaurar terapéuticamente la inhibición de GABA (Khanna *et al.*, 2013; Alessi *et al.*, 2014; De los Heros *et al.*, 2014; Kahle & Delpire, 2016; Duy *et al.*, 2019).

Además, dado que las WNK son sensores de Cl^- ya que detectan cambios en la concentración intracelular del cloruro, la inhibición de estas moléculas podría prevenir los mecanismos de retroalimentación que contrarrestarían los efectos de dirigirse a NKCC1 o KCC2 y así restaurar la inhibición inotrópica para enfermedades de desarrollo neurológico como la epilepsia (Khanna *et al.*, 2013; Kahle & Delpire, 2016).

Bibliografía



1. Alessi, R., Zhang, J., Khanna, A., Hochdörfer, T., Shang, Y., Kahle, K. (2014). The WNK-SPAK/OSR1 pathway: Master regulator of cation-chloride cotransporters. *Sci Signal*. 7:re3 doi: 10.1126/scisignal.2005365
2. Aparicio, J. Barcia, J., García, R., García, F., Molet, F., Robaina, F., Rumiá, R., Seijo, F., García, E., Albusua, J., Gelabert, M., Ramos, E., Bilbao, G., Marique, M., Alberdi, J., Katati, M., Martínez, R., Botella, C., Muñoz, J., Montero, J., Paz, J., Roldán, P., García, G., Del Álamo, M., Ayerbe, J., Guridi, J. (2009) Guías clínicas para la cirugía de la epilepsia y de los trastornos del movimiento. *Neurocirugía*. 20:329-334.
3. Arroyo, J., Kahle, K., Gamba, G. (2013). The SLC12 family of electroneutral cation-coupled chloride cotransporters. *Molecular Aspects of Medicine*. 34(2013):288-298.
4. Asadi-Pooya, A. (2018). Lennox-Gastaut syndrome: a comprehensive review. *Neurol Sci*. 39(3):403-414.



5. Bazúa, S., Chávez, M., Rojas, L., González, X., Vázquez, N., Rodríguez, A., Argaiz, E., Melo, Z., Plata, C., Ellison, D., García, J., Hadchouel, J., Gamba, G. (2015). The effect of WNK4 on the Na⁺-Cl⁻ cotransporter is modulated by intracellular chloride. *J Am Soc Nephrol*. 26(8):1781-1786.
6. Belietti, M., Casoli, T., Di Stefano, G., Giorgetti, B., Aicardi, G., Fattoretti, P. (2010). Ketogenic diets: An historical antiepileptic therapy with promising potentialities for the aging brain. *Ageing Research Review*, 9, 273-279.

7. Bellemer, A., Hirata, T., Romero, M., Koelle, M. (2011). Two types of chloride transporters are required for GABA (A) receptor-mediated inhibition in *C. elegans*. *EMBO J.* 30(9): 1852-1863.
8. Ben-Ari, Y. (2017). NKCC1 Chloride importer antagonists attenuate many neurological and psychiatric disorders. *Trends in Neurosciences.* 40(9):536-554.
9. Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J., Tyzio, R., Khazipov, R. (2007). GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol. Rep.* 87:1215-1284.
10. Ben-Ari, Y., Khalilov, I., Kahle, K., Cherubini, E. (2012). The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist.* 18(5): 467-486.
11. Brandt, C., Nozadza, M., Heuchert, N., Rattka, M., Löscher, W. (2010). Disease-Modifying effects of phenobarbital and the NKCC1 inhibitor Bumetanide in the Pilocarpine model of temporal Lobe Epilepsy. *JNeuroscience.* 30(25):8602-8612.

C

12. Calderón, M., Portillo, E., López, M., Muñoz, B., Blanco, B., Madruga, M., Luego, O. (2018). Cryptogenic West syndrome: Clinical profile, response to treatment and prognostic factors. *An Pediatr (Barc).* 89(3):176-182.
13. Caraballo, R & Vining, E. (2012). Ketogenic diet. *Handbook Clinical Neurology.* 108:783-793.

14. Chakraborti, A., Shaikh, M., Vezzani, A., Malin, J. (2019). Editorial: Experimental models of Epilepsy and related comorbidities. *Front. Pharmacol.* 10(179).
15. Chamma, I., Chevy, Q., Christophe, J., Lévi, S. (2012). Role of the neuronal K-Cl Co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. *Front. Cell. Neurosci.* 6. doi.org/10.3389/fncel.2012.00005

D

16. De Cabo, C., Villanueva, P., Prieto, A. (2006). The neurochemistry of epilepsy, inhibitory neurotransmission, and experimental models: new perspectives. *REV NEUROL.* 42:159-168.
17. De los Heros, P., Alessi, D., Groulay, R., Campbell, D., Deak, M., Macartney, T., Kahle, K., Zhang, J. (2014). The WNK-regulated SPAK/OSR1 kinases directly phosphorylate and inhibit the K⁺-Cl⁻ co-transporters. *Biochem J.* 458: 559-573.
18. Di Cristo, G., Awad, P., Hamidi, S., Avoli, M. (2017). KCC2, epileptiform synchronization, and epileptic disorders. *Prog Neurobiol.* 162:1-16.
19. Ding, Y., Wang, S., Zhang, M., Guo, Y., Ynag, Y., Weng, S., Wu, X., Ding, M. (2010). Fructose-1,6-diphosphate inhibits seizure acquisition in fast hippocampal kindling. *Neurosci Lett*, 477(1):33–36.
20. Duy, P., David, W., Kahle, K. (2019) Identification of KCC2 mutations in human epilepsy suggests strategies for therapeutic transporter modulation. *Front. Cell. Neurosci.* 13:515.
21. Dzhala V., Kuchibhotla, K., Glykys, J., Kahle, K., Swiercz, W., Feng, G., Kuner, T., Augustine, G., Bacskai, B., Staley, K. (2010). Progressive NKCC- dependent

neuronal chloride accumulation during neonatal seizures. *J Neurosci.* 30(35):11745-11761.

22. Dzhala, V., Talos, D., Sdrulla, D., Brumback, A., Mathews, G., Benke, T., Delpire, E., Jensen F., Staley, K. (2005). NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med.* 11(11):1205-1213.

F

23. Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Perucca, E. (2014). Definición Clínica práctica de la epilepsia. Stanford University School of Medicine, Department of Neurology & Neurological sciences, California.
24. Frangaj, A., Fan, Q. (2018). Structural biology of GABAB receptor. *Neuropharm.* 1(136):68-79.

G

25. Gamba, G. (2005). Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev.*85(2): 423-493.
26. García Martín, G., & Serrano Castro, P. (2018). Epidemiología de la epilepsia en España y Latinoamérica. *Rev Neurol*, 67(7), 249-262.
27. González, M. (2016). Regulation of cell surface expression of chloride transporters during epileptogenesis. *Neurosci Lett.* 628:213-218.
28. Griffin, A., Hamling, K., Hong, S., Anva, M., Lee, L., Baraban, S. (2018). Preclinical animal models for Dravet Syndrome seizure phenotypes, comorbidities and drug screening. *Front. Pharmacol.* 9:573.
29. Griffin, A., Krasniak, C., Baraban, S. (2016). Advancing epilepsy treatment through personalized genetic zebrafish models. *Prog. Brain Res.* 226: 195-107.

H

30. Hampel, P., Johne, M., Gailus, B., Vogel, A., Schidlitzki, A., Gericke, B., Töllner, K., Theilmann, W., Käufer, C., Römermann, K., Kaila, K., Löscher, W. (2021). Deletion of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 results in a more severe epileptic phenotype in the intrahippocampal kainate mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* 152:105297.
31. Hekmat, D., Mercado, A., Fajilan, A., Lee, A., Hsu, R., Mount, D., Tanouye, M. (2010). Seizure sensitivity is ameliorated by targeted expression of K⁺-Cl⁻ cotransporter function in the mushroom body of the drosophila brain. *Genetics.* 184(1):171-183.
32. Heubl, M., Zhang, J., Pressey, J., Awabdh, S., Renner, M., Gomez, F., Moutkine, E., Russeau, M., Kahle, K., Poncer, J., Lévi. (2017). GABA_A receptor dependent synaptic inhibition rapidly tune KCC2 activity via the Cl⁻-sensitive WNK1 kinase. *Nat Commun.* 8:1776.
33. Huang, H., Song, S., Banerjee, S., Jiang, T., Zhang, J., Kahle, T., Sun, D., Zhang, Z. (2019). The WNK-SPAK/OSR1 Kinases and the Cation-Chloride Cotransporters as therapeutic targets for neurological diseases. *Aging and Disease.* 10(3):626-636.
34. Huberfeld, G., Wittner, L., Clemenceau, S., Baulac, M., Kaila, K., Miles, R., Rivera, C. (2007). Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci.* 27(37):9866-9873.
35. Hübner, C., Stein, V., Hermans, I., Meyer, T., Ballanyi, K., Jentsch, T. (2001). Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron.* 30:515-524.

36. Hyde, T., Lipska, B., Ali, T., Mathew, S., Law, A., Metitiri, O., Straub, R., Ye, T., Colantuoni, C., Herman, M., Bigelow, L., Weinberger, D., Kleinman, J. (2011). Expression of GABA signaling molecules KCC2, NKCC1 and GAD1 in cortical development and Schizophrenia. *J. Neurosci.* 31(30):11088-11095.

I

37. ILAE (Liga Internacional Contra la Epilepsia). Recuperado el 23 de mayo del 2021, de <https://www.ilae.org/guidelines/definition-and-classification/ilaeclassification-of-the-epilepsies-2017>

J

38. Jansen, L., Peugh, L., Roden, W., Ojemann, J. (2010). Impaired maturation of cortical GABAA receptor expression in pediatric epilepsy. *Epilepsia* 51(8): 1456-1467.
39. Jin, Z., Kumar, S., Birnir, B. (2013). GABA is an effective immunomodulatory molecule. *Amino Acids.* 45:87-94.
40. Johan, M., Meng, B., Yap, J., Kumari, Y., Shaikh, M. (2108). A systematic review on non-mammalian models in Epilepsy research. *Front. Pharmacol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00655>

K

41. Kahle, K., Delpire, E. (2016). Kinase-KCC2 coupling: Cl⁻ rheostasis, disease susceptibility, therapeutic target. *J Neurophysiol.* 115(1):8-18.
42. Kahle, K., Rinehart, J., Lifton, R. (2010). Phosphoregulation of the Na-K-2Cl and K-Cl cotransporters by the WNK kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1802(12):1150-1158.

43. Kahle, K., Rinehart, J., Ring, A., Gimenez, I., Gamba, G., Hebert, S., Lifton, R. (2006). WNK protein kinases modulate cellular Cl⁻ flux by altering the phosphorylation state of the Na-K-Cl and K-Cl cotransporters. *Physiology (Bethesda)*. 21:326-235.
44. Kahle, K., Staley, K., Nahed, B., Gamba, G., Hebert, S., Lifton, R., Mount, D. (2008). Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nature Clinical Practice Neurology*. 4(9):490-503.
45. Kahle, K., Merner, N., Friedel, P., Silayeva, L., Liang, B., Khanna, A., Shang, Y., Lachance-Touchette, P., Bourossa, C., Levert, A., Dion, P., Walcott, B., Spiegelman, D., Dionne-Laporte, A., Hodgkinson, A., Awadalla, P., Nikbakhat, H., Majewski, J., Cossette, P., Deeb, T., Moss, S., Medina, I., Rouleau, G. (2014). Genetically encoded impairment of neuronal KCC2 cotransporter function in human idiopathic generalised epilepsy. *EMBO reports*. 15:766-774.
46. Khatep, M., Bosak, N., Herskovitz, M. (2021). The effect of Anti-seizure medications on the propagation of epileptic activity: A review. *Front. Neurol.* 12:674182.
47. Kasahara, Y., Ikegaya, Y., Koyoma. (2018). Neonatal seizure models to study epileptogenesis. *Front. Pharmacol.* 9:385.
48. Khalilov, I., Chazal, G., Chudotvorava, I., Pellegrino, C., Corby, S., Ferrand, N., Gubkina, O., Nardou, R., Tyzio, R., Yamamoto, S., Jentsch, T., Hübner, C., Gaiarsa, J., Ben-Ari, Y., Medina, I. (2011). Enhanced synaptic activity and epileptiform events in the embryonic KCC2 deficient hippocampus. *Front. Cell. Neurosci.* 5(23):1-8.
49. Khanna, A., Walcott, B., Kahle, K. (2013). Limitations of current GABA agonists in neonatal seizures: toward GABA modulation via the targeting of neuronal Cl⁻ transport. *Front. Neurol.* 4(78):1-9.

50. Khateb, M., Bosak, N., Herskovitz, M. (2021). The effect of Anti-seizure Medications on the propagation of Epileptic activity: A review. *Front Neurol.* 12:674182.
51. Kim, H., Yoo, S., Jeon, Y., Yi, S., Kim, S., Choi, S., Hwang, Kim, K. (2020). Characterization of Anti-seizure medication treatment pathways in pediatric epilepsy using the electronic health record-based common data model. *Front Neurol.* 11:409.
52. Kourdougli, N., Pellegrino, C., Renko, J., Khiryg, S., Chazal, G., Kukko, T., Lauri, S., Gaiarsa J., Zhou, L., Peret, A., Castrén, E., Tuominen, R., Crépel, V., Rivera, C. (2017). Depolarizing GABA contributes to glutamatergic network rewiring in epilepsy. *Ann Neurol.* 81(2):251-265.

L

53. Lai, C. Lai, Y. (1991). History of epilepsy in chinese traditional medicine. *Epilepsia.* 33(3):299-302.
54. Lee, H., Xiu-Qing, C., Liu, Y., Aizenman E., Kandler, K. (2005). KCC2 expression in immature rat cortical neurons is sufficient to switch the polarity of GABA responses. *Eur j Neurosci.* 21(9):2593-2599.
55. Liu, R., Wang, J., Liang, S., Zhang, G., Yang, X. (2020). Role of NKCC1 and KCC2 in Epilepsy: From expression to function. *Front. Neurol.* 10:1407.
56. Löscher, W. (2011). Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure.* 20(5): 359-368.

M

57. Magiorkinis, E., Sidirapoulou, K., Diamantis, A. (2010). Hallmarks in the history of epilepsy: Epilepsy un antiquity. *Epilepsy & Behavior*. 17:103-108.
58. Magiorkinis, E., Diamantis, A., Sidiropoulou, K., Panteliadis, C. (2014). Highigts in the History of epilepsy: The last 200 years. *Epilepsy Research and Treatment*. 2014:1-13.
59. Márquez, L. (2020). Análisis longitudinal de los cambios en la microestructura del sistema límbico en un modelo de epilepsia crónica. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
60. Meador, K. Loring, D., Flanigin, H. (1989). History of Epilepsy surgery. *Epilepsy*. 2:21-25.
61. Melo, Z. (2014). Mecanismos de regulación de los cotransportadores de Potasio:Cloruro. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
62. Mercado, A. & Melo, Z. (2014). Aspectos fisiológicos de los cotransportadores de K⁺:Cl⁻. *Revista de investigación clínica*. 66(2):173-180.
63. Moore, Y., Kelley, M., Brandon, N., Deeb, T., Moss, S. (2017). Seizing control of KCC2: A new therapeutic target for Epilepsy. *Trends in Neurosciences*. 40(9):555-571.
64. Moore, Y. Deep, T., Chadchankar, H., Brandon, N., Moss, S. (2018). Potentiating KCC2 activity is sufficient to limit the onset and severity of seizures. *Proc Natl Acad Sci USA*. 115: 10166-10171.

65. Murillo, A., Chávez, M., De los Heros, P., Gamba, G., Castañeda, M. (2020). Physiological processes modulated by the Chloride-sensitive WNK-SPAK/OSR1 Kinase signaling pathway and the Cation-Coupled Chloride Cotransporters. *Front. Physiol.* 11:1353.



66. Nevitt, S., Sudell, M., Weston, J., Tudur, C., Marson, A. (2017). Antiepileptic drug monotherapy for epilepsy: a network meta-analysis of individual participant data. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi: 10.1002/14651858.cd011412.pub3

67. Nogueira, G., Santos, L., Rodrigues, A., Scorza, F., Cavalheiro, E., Almeida, A. (2015). Enhanced nonsynaptic epileptiform activity in the dentate gyrus after kainate-induced status epilepticus. *Neuroscience*. 303:59-72.

68. Noriega Morales, G. & Shkurovich Bialik, P. (2020). Situación de la epilepsia en México y América Latina. *An Med*, 65(3): 224-232.



69. OMS. (2015). Carga mundial de la epilepsia y necesidad de medidas coordinadas en los países para abordar sus consecuencias sanitarias y sociales y su conocimiento por el público. Obtenido de <https://www.who.int/topics/epilepsy/es/>.

70. OMS. (2019). Epilepsia: un imperativo de salud pública. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. Obtenido de <https://www.who.int/topics/epilepsy/es/>.



71. Panebianco, M., Rigby, A., Weston, J., Marson, A. (2015) Vagus nerve stimulation for partial seizures. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi: 10.1002/14651858.cd002896.pub2

72. Perucca, E., Meador, K. (2005). Adverse effects of antiepileptic drugs. *Acta Neurol Scand.* 112(s181): 30-35.
73. Pfeffer, C., Stain, V., Keating, D., Maier, H., Rinke, I., Rudhard, Y., Hentschke, M., Rune, G., Jentsh, T., Hübner, C. (2009). NKCC1-dependent GABAergic excitation drives synaptic network maturation during early Hippocampal development. *J Neurosci.* 29(11):3419-3430.
74. Piali, A., Moon, T., Akella, R., He, H., Cobb, M., Goldsmith, E. (2014). Chloride sensing by WNK1 kinase involves inhibition of autophosphorylation. *Sci Signal.* 7(324): ra41.
75. Pitkänen, A., Lukasiuk, K., Dudek, F., Staley, K. (2015). Epileptogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 5(10): a022822.
76. Puskarjov, M., Seja, P., Heron, s., Williams, T., Ahmad, F., Iona X., et al. (2014). A variant of KCC2 from patients with seizures impairs neuronal Cl⁻ extrusion and dendritic spine formation. *EMBO Rep.* 15:723-729. doi: 10.1002/embr.201438749

R

77. Ruíz, M., Olivares, Z., Vela, M., Collado, M. (2000) Dieta cetogénica. Una alternativa terapéutica para la epilepsia refractaria. *Nutrición Clínica.* 3(1):9-14.

S

78. Saito, T., Ishii, A., Sugai, K., Sasaki, M., Hirose, S. (2017). A de novo missense mutation in SLC125A found in a compound heterozygote patient with epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Clin Genet.* 92(6):654-658.

79. Saitsu, H., Watanabe, M., Akita, T., Ohba, C., Sugai, K., Peitee Ong, W., Shiraishi, H., Yuasa, S., Matsumoto, H., Teik Beng, K., Saitoh, S., Miyatake, S., Nakashima, M., Miyake, N., Kato, M., Fukuda, A., Matsumoto, N. (2016). Impaired neuronal KCC2 function by bi-allelic SLC12A5 mutations in migrating focal seizures and severe developmental delay. *Sci Rep.* 6:30072.
80. Shorvon, S. D. (2011). The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia.* 55(6): 1052-1057.
81. Silayeva, L., Deeb, T., Hines, R., Kelley, M., Munoz, M., Lee, H., Brandon, N., Dunlop, J., Maguire, J., Davies, P., Moss, S. (2015). KCC2 activity is critical in limiting the onset and severity of status epilepticus. *PNAS.* 112(11):3523-3528.
82. Sipilä, S., Huttu, K., Yamada, J., Afzalov, R., Voipio, J., Blaesse, P., Kaila, K. (2009). Compensatory enhancement of intrinsic spiking upon NKCC1 disruption in neonatal hippocampus. *J Neurosci.* 29(21): 6982-6988.
83. Schulte, J., Wierenga, C., Bruining, H. (2018). Chloride transporters and GABA polarity in developmental, neurological and psychiatric conditions. *Neurosci Biobehav Rev.* 90:260-271.
84. Shekarabi, M., Zhang, J., Khanna, A., Ellison, D., Delpire, E., Kahle, K. (2017). WNK Kinase signaling in ion homeostasis and human disease. *Cell Metabolism.* 25(2):285-299.

85. Scheffer, I., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M., French, J., Guilhoto, L, Hirsh, E., Jain, S., Mathern, G., Moshe, S., Nordli, D., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhnag, Y.&Sammer, Z. (2017). Clasificación de las epilepsias de la ILAE: Documento de posición de la comisión de clasificación y terminología de la ILAE. Recuperado el 23 de mayo del 2021, de <https://www.ilae.org/files/ilaeGuideline/ClassificationEpilepsies-Scheffer2017-Spanish.pdf>
86. Schomberg, S., Bauer, J., Kintner, D., Su, G., Flemmer, A., Forbush, B., Sun, D. (2003). Cross talk between rh GABA(A) receptor and the Na-K-Cl cotransporter is mediated by intracellular Cl⁻. *Neurophysiol.* 89(1):159-167.
87. Solomon, S., Meor, N., Zhang, J. (2021). Targeting the WNK-SPAK/OSR1 Pathway and Cation-Chloride Cotransporters for the Therapy of Stroke. *Int J Mol Sci.* 22(3):1232.
88. Stödberg, T., McTague, A., Ruiz, A., Hirata, H., Zhen, J., Long, P., Farabella, I., Meyer, E., Kawahara, A., Vassallo, G., Stivaros, S., Bjursell, M., Stranneheim, H., Tigerschiöld, S., Persson, B., Bangash, I., Das, K., Hughes, D., Lesko, N., Lundeberg, J., Scott, R., Poduri, A., Scheffer, I., Smith, H., Gissen, P., Schorge, S., Reith, M., Tops, M., Kullmann, D., Harvey, R., Wedell, A., Kurian, M. (2015). Mutations in SLC12A5 in epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Nat Commun.*6:8038.

T

89. Taylor, C., An, S., Gallolu, S., Stippec, S., Earnest, S., Trivedi, A., Zijiang, J., Mirzaei, H., Huang, C., Cobb, M. (2018). OSR1 regulates a subset of inward rectifier potassium channels via a binding motif variant. *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 115(15):3840-3845.
90. Temkin, O. (1971). The Falling Sicknees: A History of Epilepsy freo the Greeks to the Beginnings of modern neurology. 2da ed. *Rev. Baltimore.* 214-215
91. Thastrup, J., Rafiqi, F., Vitari, A., Pozo, E., Deak, M., Mehellou, Y., Alessi, D. (2012) SPAK/OSR1 regulate NKCC1 and WNK activity: analysis of WNK isoform interactions and activation by T-loop trns-autophosphorylation. *Biochem J.* 441(Pt1):325-337.
92. Till, Á., Szalai, R., Hegyi, M., Kövesdi, E., Büki, G., Hadzsiev, K., Meleg, B. (2019). A rare form of ion channer gene mutation identified as underlying cause of generalize epilepsy. *Orv. Hetil.* 160:835-838.

U

93. Uusi-Oukari, M., & Korpi, E. (2010) Regulation of GABAA receptor subunit expression by pharmacological agents. *Pharmacol Rev.* 62(1):97-135.

W

94. Watanabe, M., Fukuda, A. (2015). Development and regulation of chloride homeostasis in the central nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* 9:371.

95. Woo, N., Lu, J., England, R., McClellan, R., Dufour, S., Mount, D., Deutch, A., et al. (2002). Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene. *Hippocampus*. 12:258-68.



96. Yamada, K., Zhang, J., Xie, X., Reinhardt, J., Xie, A., LaSala, D., et al. (2016). Discovery and characterization of allosteric WNK kinase inhibitors. *ACS Chem. Biol.* 11: 3338-3346.



97. Zhang, S., Zhou, J., Zhang, Y., Liu, T., Friedel, P., Zhuo, W., Somasekhara, S., Roy, K., Zhang, L., Liu, Y., Meng, X., Deng, H., Zeng, W., Li, G., Forbush, B., Yang, M. (2021). The structural basis of function and regulation of neuronal cotransporters NKCC1 and KCC2. *Commun Biol.* 4(1):226.