

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**“CAMBIOS EN LOS AMINOÁCIDOS EXCITATORIOS E INHIBITORIOS Y  
DEL COMPLEJO GABA<sub>A</sub>/BDZ, PRODUCIDOS POR CRISIS  
HIPERTÉRMICAS EN RATAS EN DESARROLLO”**

Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Presenta: **Biólogo Misael González Ramírez.**

**Tutora.**

Dra. Luisa L. Rocha Arrieta

**Comité Tutorial:**

Dr. Gabriel Roldán Roldán

Dr. Alfredo Feria Velasco

Sitios donde se desarrolló el proyecto.

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI. Av. Cuauhtémoc 330, Colonia Doctores, C.P. 06720. México, D.F. Tel. y Fax 5578-0240.

Departamento de Farmacobiología, CINVESTAV Sede Sur. Av. Tenorios 235. Colonia Granjas Coapa, C.P. 14330. México, D.F., Teléfono 5061-2859. Fax 5061-2863.



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.

## Índice

|  | Página |
|--|--------|
| Índice de tablas. . . . .  | 6      |
| Índice de figuras. . . . .                                       | 7      |
| Abreviaciones. . . . .   | 9      |
| Resumen. . . . .   | 11     |
| 1. Antecedentes. . . . .   | 12     |
| 1.1 Definición de epilepsia. . . . .                             | 12     |
| 1.2 Fases de las crisis epilépticas. . . . .                     | 13     |
| 1.2.1 Fase ictal o ictus. . . . .                                | 13     |
| 1.2.2 Fase postictal. . . . .                                    | 13     |
| 1.2.3 Fase Interictal. . . . .                                   | 13     |
| 1.3 Clasificación de los síndromes epilépticos. . . . .          | 14     |
| 1.4 Epilepsia del Lóbulo Temporal (ELT). . . . .                 | 16     |
| 1.4.1 Características clínicas de la ELT. . . . .                | 16     |
| 1.4.2 Causas de la ELT. . . . .                                  | 17     |
| 1.4.2.1 Anatómicas. . . . .                                      | 17     |
| 1.4.2.1.1 Esclerosis mesial. . . . .                             | 17     |
| 1.4.2.1.2 Lesión ocupativa. . . . .                              | 18     |
| 1.4.2.1.3 Causas de ELT no asociadas con anomalías estructurales | 18     |
| 1.4.2.1.4 Causas genéticas de ELT. . . . .                       | 19     |
| 1.4.2.1.5 Causas celulares de ELT. . . . .                       | 19     |
| a) Hipótesis de células en canasta inactivas. . . . .            | 20     |
| b) Hipótesis de la reborización de las fibras musgosas. . . . .  | 20     |
| c) Implicación de otras estructuras. . . . .                     | 20     |
| 1.4.3 Hallazgos asociados a ELT. . . . .                         | 22     |
| 1.4.3.1 Imagen por Resonancia Magnética (IRM) . . . . .          | 22     |
| 1.4.3.2 Aminoácidos excitatorios en la ELT. . . . .              | 23     |
| 1.4.3.3 GABA en la ELT. . . . .                                  | 26     |
| 1.4.4 Tratamiento de la ELT. . . . .                             | 31     |

|  |    |
|--|----|
| 1.4.4.1 Tratamiento farmacológico de la ELT. ....                            | 31 |
| 1.4.4.2 Tratamiento quirúrgico de la ELT. ....                               | 33 |
| 1.5 “Kindling” y Ácido Kaínico como modelos experimentales de ELT. ....      | 34 |
| 1.5.1 “Kindling”. ....   | 34 |
| 1.5.1.1 Características del modelo “kindling”. . . . .                       | 35 |
| 1.5.1.1.1 Aminoácidos excitatorios y “kindling”. . . . .                     | 35 |
| 1.5.1.1.2 GABA y “kindling”. . . . .   | 36 |
| 1.5.2 Ácido kaínico (AK). . . . .  | 38 |
| 1.5.2.1 Características del modelo de ácido kaínico. . . . .                 | 38 |
| 1.5.2.1.1 Aminoácidos excitatorios y AK. . . . .                             | 38 |
| 1.5.2.1.2 GABA y AK. . . . .   | 39 |
| 1.6 Crisis febriles. . . . .   | 40 |
| 1.6.1 Crisis febriles en el cerebro inmaduro como causa de ELT. . . . .      | 40 |
| 1.6.2 Métodos experimentales para inducir crisis hipertérmicas (CH). . . . . | 42 |
| 1.6.2.1 Método con luz infrarroja. . . . .                                   | 42 |
| 1.6.2.2 Método con microondas. . . . .                                       | 42 |
| 1.6.2.3 Método con aire caliente. . . . .                                    | 43 |
| 1.6.2.4 Inducción de CH por el método de Baram. . . . .                      | 43 |
| 2. Planteamiento del problema. . . . .                                       | 45 |
| 3. Justificación. . . . .  | 45 |
| 4. Hipótesis. . . . .  | 46 |
| 5. Objetivos. . . . .  | 46 |
| 5.1 Objetivo general. . . . .  | 46 |
| 5.2 Objetivos específicos. . . . .   | 46 |
| 6. Materiales y métodos. . . . .   | 47 |
| 6.1 Animales. . . . .  | 47 |
| 6.2 Modelo de CH inducidas por hipertermia. . . . .                          | 47 |
| 6.3 Inducción de hipertermia sin crisis (HIP). . . . .                       | 48 |
| 6.4 Grupos experimentales. . . . .   | 48 |
| 6.4.1 Experimentos para evaluar los efectos de las CH. . . . .               | 48 |
| 6.4.1.1 A los 30 min después de las CH. . . . .                              | 48 |

|   |    |
|---|----|
| 6.4.1.2 A las 24 h después de las CH. . . . .   | 48 |
| 6.4.1.3 A los 20 días después de las CH. . . . .  | 48 |
| 6.4.2 Experimentos para evaluar los efectos de la HIP. . . . .  | 49 |
| 6.4.2.1 A los 30 min después de la HIP. . . . .   | 49 |
| 6.4.2.2 A las 24 h después de la HIP. . . . .   | 49 |
| 6.4.2.3 A los 20 días después de la HIP. . . . .  | 49 |
| 6.5 Evaluación del efecto del pentilenetetrazol (PTZ). . . . .  | 50 |
| 6.6 Autorradiografía para receptores a GABA y BDZ. . . . .  | 50 |
| 6.7 Determinación de aminoácidos por cromatografía líquida de alta<br>resolución (CLAR) y de proteínas. . . . . | 51 |
| 6.8. Análisis estadístico. . . . .  | 54 |
| 7. Resultados. . . . .  | 55 |
| 7.1 Cambios conductuales durante la producción de CH. . . . .   | 55 |
| 7.2 Efectos de la CH en la susceptibilidad a crisis por PTZ. . . . .  | 56 |
| 7.2.1 Efectos del PTZ a los 30 min después de las CH. . . . .   | 56 |
| 7.2.2 Efectos del PTZ a las 24 h después de las CH. . . . .   | 56 |
| 7.2.3 Efectos del PTZ a los 20 días después de las CH. . . . .  | 57 |
| 7.3 Efectos de la hipertermia en la susceptibilidad a crisis por PTZ. . . . .                                   | 57 |
| 7.3.1 Efectos del PTZ a las 24 h después de la HIP. . . . .   | 57 |
| 7.3.2 Efectos del PTZ a los 20 días después de la HIP. . . . .  | 58 |
| 7.4 Efecto de las CH en la unión de receptores a GABA <sub>A</sub> y BDZ. . . . .                               | 69 |
| 7.4.1 Receptores a GABA <sub>A</sub> y BDZ 30 min después de las CH. . . . .                                    | 69 |
| 7.4.2 Receptores a GABA <sub>A</sub> y BDZ 24 h después de las CH. . . . .                                      | 70 |
| 7.4.3 Receptores a GABA <sub>A</sub> y BDZ 20 días después de las CH. . . . .                                   | 70 |
| 7.5 Efecto de la HIP en la unión de receptores a GABA <sub>A</sub> y BDZ. . . . .                               | 71 |
| 7.5.1 Receptores a GABA <sub>A</sub> y BDZ 30 min después de la HIP. . . . .                                    | 71 |
| 7.5.2 Receptores a GABA <sub>A</sub> y BDZ 24 h después de la HIP. . . . .                                      | 72 |
| 7.5.3 Receptores a GABA <sub>A</sub> y BDZ 20 días después de la HIP. . . . .                                   | 73 |
| 7.6 Efecto de las CH en el contenido tisular de aminoácidos. . . . .  | 91 |
| 7.6.1 Contenido tisular de aminoácidos 30 min después de las CH. . . . .  | 91 |
| 7.6.2 Contenido tisular de aminoácidos 24 h después de las CH. . . . .  | 92 |

|   |     |
|---|-----|
| 7.6.3 Contenido tisular de aminoácidos 20 días después de las CH. . . . .                   | 92  |
| 8. Discusión. . . . .   | 101 |
| 8.1 Efecto de las CH y la HIP en la susceptibilidad al PTZ. . . . .                         | 101 |
| 8.2 Efecto de las CH y la HIP en la unión a los receptores GABA <sub>A</sub> y BDZ. . . . . | 106 |
| 8.3 Efecto de las CH en los niveles titulares de aminoácidos. . . . .                       | 112 |
| 10. Perspectivas. . . . .   | 122 |
| 11. Bibliografía. . . . .   | 114 |

## Índice de Tablas

|   |     |
|---|-----|
| Tabla I. Clasificación de síndromes epilépticos. . . . .                              | 15  |
| Tabla II. Fármacos antiepilépticos. . . . .   | 32  |
| Tabla III. Gradiente utilizado para la elusión de aminoácidos. . . . .                | 53  |
| Tabla IV. Unión del [ <sup>3</sup> Hmuscimol] 30 min después de las CH. . . . .       | 79  |
| Tabla V. Unión del [ <sup>3</sup> Hflunitracepam] 30 min después de las CH. . . . .   | 80  |
| Tabla VI. Unión del [ <sup>3</sup> Hmuscimol] 24 h después de las CH. . . . .         | 81  |
| Tabla VII. Unión del [ <sup>3</sup> Hflunitracepam] 24 h después de las CH. . . . .   | 82  |
| Tabla VIII. Unión del [ <sup>3</sup> Hmuscimol] 20 días después de las CH. . . . .    | 83  |
| Tabla IX. Unión del [ <sup>3</sup> Hflunitracepam] 20 días después de las CH. . . . . | 84  |
| Tabla X. Unión del [ <sup>3</sup> Hmuscimol] 30 min después de la HIP. . . . .        | 85  |
| Tabla XI. Unión del [ <sup>3</sup> Hflunitracepam] 30 min después de la HIP. . . . .  | 86  |
| Tabla XII. Unión del [ <sup>3</sup> Hmuscimol] 24 h después de la HIP. . . . .        | 87  |
| Tabla XIII. Unión del [ <sup>3</sup> Hflunitracepam] 24 h después de la HIP. . . . .  | 88  |
| Tabla XIV. Unión del [ <sup>3</sup> Hmuscimol] 20 días después de la HIP. . . . .     | 89  |
| Tabla XV. Unión del [ <sup>3</sup> Hflunitracepam] 20 días después de la HIP. . . . . | 90  |
| Tabla XVI. Contenido tisular de aminoácidos 30 min después de las CH. . . . .         | 98  |
| Tabla XVII. Contenido tisular de aminoácidos 24 h después de las CH. . . . .          | 99  |
| Tabla XVIII. Contenido tisular de aminoácidos 20 días después de las CH. . . . .      | 100 |

## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Hipótesis que explica el incremento de la excitabilidad. . . . .  | 21 |
| Figura 2. Síntesis y metabolismo del glutamato. . . . .   | 24 |
| Figura 3. Características del receptor ionotrópico y metabotrópico. . . . .   | 25 |
| Figura 4. Síntesis y metabolismo del GABA. . . . .  | 27 |
| Figura 5. Características del receptor GABA <sub>A</sub> . . . . .  | 28 |
| Figura 6. Reacción de derivatización. . . . .   | 55 |
| Figura 7. Latencia 30 minutos después de las CH. . . . .  | 59 |
| Figura 8. Incidencia de animales 30 min después de las CH. . . . .  | 60 |
| Figura 9. Latencia 24 h después de las CH. . . . .  | 61 |
| Figura 10. Incidencia de animales 24 h después de las CH. . . . .   | 62 |
| Figura 11. Latencia 20 días después de las CH. . . . .  | 63 |
| Figura 12. Incidencia de animales 20 días después de las CH. . . . .  | 64 |
| Figura 13. Latencia 24 h después de la HIP. . . . .   | 65 |
| Figura 14. Incidencia de animales 24 h después de la HIP. . . . .   | 66 |
| Figura 15. Latencia 20 días después de la HIP. . . . .  | 67 |
| Figura 16. Incidencia de animales 20 días después de la HIP. . . . .  | 68 |
| Figura 17. Distribución de la unión del [ <sup>3</sup> H]muscimol. . . . .  | 74 |
| Figura 18. Distribución de la unión del [ <sup>3</sup> H]flunitracepam. . . . .   | 75 |
| Figura 19. Porcentaje de cambio en la unión del [ <sup>3</sup> H]muscimol y [ <sup>3</sup> H]flunitracepam, 30 minutos, 24 h y 20 días después de las CH. . . . . | 76 |
| Figura 20. Porcentaje de cambio en la unión del [ <sup>3</sup> H]muscimol y [ <sup>3</sup> H]flunitracepam, 30 minutos, 24 h y 20 días después de las CH. . . . . | 77 |
| Figura 21. Porcentaje de cambio en la unión [ <sup>3</sup> H]muscimol y [ <sup>3</sup> H]flunitracepam, 30 minutos, 24 h y 20 días después de las CH. . . . .     | 78 |
| Figura 22. Porcentaje de cambio en el contenido tisular de GABA, 30 minutos, 24 h y 20 días después de las CH. . . . .  | 94 |
| Figura 23. Porcentaje de cambio en el contenido tisular de glutamina, 30 minutos, 24 h y 20 días después de las CH. . . . .                                       | 95 |

Figura 24. Porcentaje de cambio en el contenido tisular de glutamato, 30 minutos, 24 h y 20 días después de las CH. . . . . 96

Figura 25. Porcentaje de cambio en el contenido tisular de aspartato, 30 minutos, 24 h y 20 días después de las CH. . . . . 97

## Lista de Abreviaturas

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| $\alpha$                       | Alfa  |
| $\alpha$ 3-5, $\delta$ .       | Subunidades del receptor GABA <sub>A</sub>          |
| AP7                            | 2-amino-7-fosfonoheptanoato                         |
| AK                             | Ácido kaínico                                       |
| AMPA                           | Acido propiónico-3-amino-4-hidroxi-5-metil-isoxasol |
| APOE- $\epsilon$ 4             | Apolipoproteína E-epsilon4                          |
| ARNm                           | Ácido Ribonúcleico mensajero                        |
| $\beta$                        | Beta  |
| $\beta$ 1-5                    | Subunidades del receptor GABA <sub>A</sub>          |
| BDZ                            | Benzodiazepina                                      |
| C                              | Células en canasta                                  |
| CH                             | Crisis hipertérmicas                                |
| CC                             | Cría control  |
| Ci/mmol                        | Curies por milimol                                  |
| cm                             | Centímetros   |
| d                              | Día   |
| DO                             | Densidades ópticas                                  |
| EEG                            | Electroencefalográficas                             |
| ELT                            | Epilepsia del lóbulo temporal                       |
| [ <sup>3</sup> H]flunitracepam | Flunitracepam tritiado                              |
| G                              | Células granulares                                  |
| $\gamma$                       | Gamma   |
| $\gamma$ 2                     | Subunidades del receptor GABA <sub>A</sub>          |
| GABA                           | Ácido $\gamma$ -amino butírico                      |
| GABA <sub>A</sub>              | Ácido $\gamma$ -amino butírico tipo A               |
| Glu                            | Ácido glutámico o glutamato                         |
| GluR2-7                        | Subunidades del receptor para Glu                   |
| °C                             | Grados centigrados                                  |
| HIP                            | Hipertermia sin crisis                              |
| h                              | Hora  |
| IRM                            | Imágen por resonancia magnética                     |
| l                              | Litro   |
| M                              | Molar   |
| $\mu$ l                        | Microlitro  |
| $\mu$ M                        | Micromolar  |
| $\mu$ m                        | Micrometros   |
| ml                             | Mililitro   |
| min                            | Minuto  |
| mM                             | Milimolar   |
| [ <sup>3</sup> H]muscimol      | Muscimol tritiado                                   |
| ng/mg                          | Nanogramos por miligramo                            |
| nm                             | Nanometros  |
| nM                             | Nanomolar   |
| NMDA                           | N-Metil-D-aspartato                                 |

NR1-2 y 2A-2B

OPA

PKA

PTZ

$\delta$

SNC

SPSS

T1

T2

$\chi^2$

Subunidades del receptor NMDA

Orto-ftaldehido

Proteína cinasa A

Pentilenetetrazol

Rho

Sistema Nervioso Central

Programa Estadístico para Ciencias Sociales

Tiempo de Relajación 1

Tiempo de Relajación 2

Prueba de chi cuadrada

## Resumen

El presente estudio se realizó con el propósito de determinar si la producción de crisis hipertérmicas (CH) en etapas tempranas de la vida es capaz de inducir cambios similares a los de la epilepsia del lóbulo temporal en el adulto. En este estudio se evaluó el efecto convulsivante del pentilenoetrazol (PTZ), la unión de los receptores GABA<sub>A</sub> y benzodiazepinas (BDZ) por autorradiografía, y el contenido tisular de aminoácidos excitatorios e inhibitorios por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en ratas expuestas previamente a crisis hipertérmicas (CH) o a hipertermia (HIP) a los 10 días de edad.

Las CH se indujeron con el método descrito por Baram y cols., (1997) que consiste en aplicar una corriente de aire moderadamente caliente, aproximadamente a 50 cm de altura hasta incrementar la temperatura corporal a 41<sup>o</sup>C. Los animales con HIP se manipularon de igual manera, excepto que fueron pretratados con pentobarbital (PTB) para evitar la producción de convulsiones. Las ratas se evaluarán a los 30 min, 24 h y 20 días después de las CH o la HIP para las diferentes estrategias experimentales; crisis mioclónicas, clónicas, tónica y muerte.

Los animales a los que se les administró PTZ a los diferentes tiempos después de CH o HIP mostraron una protección que se reflejó en aumento de la latencia a los diferentes tipos de convulsiones, incidencia de las mismas y muerte. Estos cambios dependieron del tiempo en el que se utilizaron así como de la presencia de CH o de HIP. En cuanto a la evaluación de la unión a receptores, los animales con CH e HIP mostraron incremento de la unión al receptor GABA<sub>A</sub> en todos los tiempos evaluados, mientras que la unión a los receptores a BDZ los animales con HIP mostraron un incremento significativo a los 3 tiempos de sacrificio, a diferencia de los animales con CH, en los que a las 24 h se observó un incremento que no se detectó a los 30 min ni a los 20 días después de las crisis.

En relación al contenido tisular de aminoácidos, los animales sacrificados 30 min después de las CH mostraron un aumento significativo de casi todos los aminoácidos, en todas las estructuras evaluadas. Los animales sacrificados a las 24 h después de las convulsiones presentaron un incremento del contenido tisular del glutamato y glutamina en el hipocampo y de aspartato y glutamato en la amígdala. Aún cuando en el tallo cerebral presentaron un aumento de la mayoría de los aminoácidos analizados, en el resto de las estructuras evaluadas se detectó un decremento del contenido tisular de la mayoría de los aminoácidos. Los animales que se sacrificaron a los 20 días después mostraron un aumento del contenido tisular de todos los aminoácidos principalmente en el estriado y el cerebelo.

Los resultados obtenidos del presente trabajo no apoyan la hipótesis de que la producción de crisis hipertérmicas en etapas tempranas de la vida inducen cambios a largo plazo similares a los observados en modelos experimentales de epilepsia del lóbulo temporal en animales adultos. Más aún, nuestros resultados demuestran que tanto las CH como la HIP producen efectos protectores y anticonvulsivantes a largo plazo.

## **1. Antecedentes**

### **1.1 Definición de epilepsia.**

La epilepsia es un trastorno recurrente y paroxístico de la función cerebral de origen multifactorial, caracterizado por alteraciones conductuales y electrográficas; causadas por una descarga neuronal anormal, excesiva, hipsincrónica y autolimitada (Commission on Classification, 1989). Etimológicamente, la palabra epilepsia se deriva del verbo griego “*epilamvaneim*” que significa “ser atacado o sorprendido”.

Una crisis convulsiva es un cambio breve en la conducta causado por la descarga sincrónica y rítmica de poblaciones de neuronas en el sistema nervioso central (SNC) (Mcnamara, 1994; MacNamara, 1999), que se asocia como la expresión clínica (síntomas y signos) del grupo de condiciones neurológicas que representa la epilepsia (Engel y Pedley, 1997).

El foco epiléptico se define electrofisiológicamente como el área cerebral que es la principal fuente de descargas epilépticas. Al respecto las descargas epilépticas pueden ser de diferentes tipos: a) focales, que se originan en un sólo foco epiléptico; cuando es bilateral e independiente sugiere la presencia de un foco epiléptico en cada

hemisferio cerebral; b) multifocal, cuando señala tres o más focos epilépticos; y c) difuso o generalizado cuando en él no hay un aparente foco epiléptico (Engel, 1989).

La lesión epileptogénica es un disturbio estructural que puede ser producido por un tumor o una cicatriz la cual da lugar a crisis epilépticas crónicas, mientras que el área del tejido cerebral del que proviene la crisis se denomina zona epileptogénica (Engel, 1989).

## **1.2 Fases de las crisis epilépticas**

En general las crisis epilépticas se dividen en tres fases o periodos:

**1.2.1 Fase Ictal o *ictus***, se refiere a la crisis epiléptica *per se* y se identifica por cambios conductuales y electrográficos que dependen del tipo de crisis. Los mecanismos exactos que determinan el inicio de una crisis convulsiva no son conocidos, aunque se propone que resultan de un desequilibrio entre los mecanismos excitatorios e inhibitorios en el SNC (Engel, 1989; 1997).

**1.2.2 Fase Postictal**, es el periodo que se presenta inmediatamente después de la fase ictal y cuya duración varía desde

unos minutos hasta días (Engel, 1989). En general, es un periodo refractario durante el cual se reduce la probabilidad de producción de una crisis convulsiva subsecuente. Acerca de los mecanismos que intervienen en la terminación postictal se sugiere la participación de neurotransmisores inhibitorios, así como de neuromoduladores. En esta fase se presenta una depresión conductual, confusión, amnesia, analgesia y paresias (parálisis ligera o incompleta) (Caldecott-Hazard y Engel, 1987; Engel, 1989).

**1.2.3 Fase Interictal**, es el período entre crisis y crisis. Se caracteriza por alteraciones electroencefalográficas (EEG) tales como espigas difusas y alteraciones en la conducta como depresión y agresividad. Se sugiere que el mecanismo que mantiene esta fase es una inhibición, que puede ser gabaérgica (Esclapez y cols., 1997; Pérez y Carlen, 1999), aunque también se ha propuesto que los mecanismos inhibitorios que mantienen la fase interictal, podrían estar relacionados con los opioides endógenos (Caldecott-Hazard, 1988; Engel, 1989; Engel y Rocha, 1992).

### **1.3 Clasificación de los síndromes epilépticos**

Actualmente las crisis epilépticas se clasifican de acuerdo a la Clasificación Internacional de las Epilepsias y de los Síndromes Epilépticos (Commission on Classification, 1989) la cual se presenta en la Tabla I.



Tabla I. Clasificación de los Síndromes Epilépticos.  
Adaptado de "Comisión on Classification" 1989.

|  |
|--|
| <p><b>1. Relacionadas con su localización</b> (focal, local y parcial).</p> <p>1.1 <b>Idiopática</b> (primaria).<br/>Epilepsia benigna de la niñez con espigas centrotemporales.<br/>Epilepsia de la niñez con paroxismas occipitales.<br/>Epilepsia primaria de lectura.</p> <p>1.2 <b>Sintomáticas</b> (secundaria).<br/>Epilepsia del lóbulo temporal.<br/>Epilepsia del lóbulo frontal.<br/>Epilepsia del lóbulo occipital.<br/>Epilepsia parcial crónica progresiva continua de la niñez.<br/>Síndromes caracterizados por crisis con modos específicos de precipitación.</p> <p>1.3 <b>Criptogénica</b> definida por:<br/>Tipo de crisis, hechos clínicos, etiología y localización anatómica.</p> <p><b>2. Generalizada.</b></p> <p>2.1 <b>Idiopática</b> (primaria)<br/>Convulsiones neonatales familiares benignas.<br/>Convulsión neonatal benigna.<br/>Epilepsia mioclónica benigna de la infancia.<br/>Epilepsia de ausencia en la niñez.<br/>Epilepsia de ausencia juvenil.<br/>Epilepsia mioclónica juvenil (petit mal).<br/>Epilepsia con crisis de gran mal.<br/>Otras epilepsias idiopáticas generalizadas.<br/>Epilepsias con crisis precipitadas por modos específicos de activación.</p> <p>2.2 <b>Criptogénica.</b><br/>Síndrome de West (espasmos infantiles).<br/>Síndrome de Lennox-Gastaut.<br/>Epilepsia con crisis mioclónica astática.<br/>Epilepsia con ausencia mioclónica.</p> <p>2.3 <b>Sintomática</b> (secundaria).<br/>2.3.1 De etiología no específica.<br/>Encefalopatía mioclónica temprana.<br/>Encefalopatía epiléptica infantil temprana.<br/>Otras epilepsias generalizadas sintomáticas.<br/>2.3.2. Síndromes específicos.<br/>Las crisis epilépticas pueden complicarse con muchas enfermedades.</p> <p><b>3. Epilepsias indeterminadas.</b></p> <p>3.1 <b>Con</b> crisis generalizadas y focales.<br/>Crisis neonatales.<br/>Epilepsia mioclónica severa en la infancia.<br/>Epilepsia con espigas-onda durante el sueño de onda baja.<br/>Afasia epiléptica adquirida.<br/>Otras epilepsias indeterminadas.</p> <p>3.2 <b>Sin</b> manifestaciones inequívocas generalizadas o focales.</p> <p><b>4. Síndromes especiales.</b></p> <p>4.1 <b>Crisis relacionadas a situaciones.</b><br/>Convulsiones febriles.<br/>Crisis aisladas o <i>status epilepticus</i> aislado.<br/>Crisis que ocurren únicamente cuando hay un evento toxico agudo debido a factores como el alcohol, drogas, eclampsia e hiperglicemia no cetónica.</p> |
|--|

## **1.4 Epilepsia del Lóbulo temporal**

La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) representa el 40% de todos los casos de epilepsia y se caracteriza por crisis convulsivas parciales complejas o secundariamente generalizadas que se generan predominantemente en estructuras límbicas mesiales, puede presentarse a cualquier edad. Las regiones del cerebro principalmente involucradas en este tipo de epilepsia son la amígdala cerebral, el hipocampo y la neocorteza temporal (Engel, 1989; 1996).

El término ELT se establece tras la lobectomía que realiza Penfield en 1954, y finalmente es modificado por Falconer en 1974. Este padecimiento es un cuadro de los llamados “epilepsia sintomática que se relaciona a la localización”, y un alto porcentaje es refractaria al tratamiento farmacológico (Engel, 1996; Engel y cols., 1997).

### **1.4.1 Características clínicas de la ELT**

Dado que las crisis se originan en un sistema íntimamente ligado a las emociones tal como es el sistema límbico, las manifestaciones clínicas de la ELT incluyen componentes afectivos y autonómicos (Engel, 1989). En los adultos, la ELT se caracteriza por crisis estereotipadas que consisten en la sensación de malestar epigástrico, detención de la actividad motora, mirada perdida, cambios en el estado de la conciencia (agitación, desorientación, confusión), automatismos oralimentarios, automatismos motores, sensación de temor con activación

autonómica que se manifiesta por la palidez de piel y mucosas, piloerección, rubefacción facial, midriasis, taquicardia y taquipnea. Estas crisis epilépticas reflejan la activación de las estructuras temporolímbicas, así como de los circuitos de la corteza prefrontal, que se relacionan con la amígdala, el giro dentado, el cíngulo y los ganglios basales (Biraben y cols., 2001; Fogarasi y cols., 2002). Algunos pacientes refieren episodios psíquicos, como de haber vivido algo previamente (*deja vu*), otros pueden experimentar no haberlo vivido antes (*jamais vu*). Además, se pueden apreciar posturas anormales de las extremidades contralaterales en un 25% de los casos, alteraciones del lenguaje durante las crisis convulsivas que sugieren un foco en el lóbulo temporal dominante o alteraciones del lenguaje en el estado postictal que sugieren un foco del lóbulo temporal no dominante. Hasta un 50% de los pacientes pueden presentar crisis tónico-clónicas secundariamente generalizadas que no son homogéneas, lo que se debe a la propagación de la actividad epiléptica a través de diferentes vías, entre las que se encuentran estructuras cerebrales profundas, como los ganglios basales (Serles y cols., 2000).

## **1.4.2 Causas de la ELT**

### **1.4.2.1 Anatómicas**

#### **1.4.2.1.1 Esclerosis Mesial**

Se sugiere que el sustrato patológico de la ELT es la esclerosis mesial temporal, la cual está presente en el 60 al 70% de todos los

pacientes con este tipo de epilepsia (Engel, 1995; Bernasconi y cols., 2005). Aunque la causa de la esclerosis hipocampal no está clara, esta lesión epileptogénica es una de las mejor caracterizadas con respecto a los mecanismos básicos como es pérdida neuronal, gliosis y consecuente atrofia (Cavalheiro y cols., 1992; Mathern y cols., 1993; Bernasconi y cols., 2005).

Existe un patrón característico de daño en la esclerosis mesial temporal en el que hay pérdida de neuronas hipocampales, principalmente en la región del hilus y el área CA1 y en menor proporción en el área CA3, el giro dentado y el presubiculum (Engel 1995).

Se observa una mayor pérdida de neuronas del hipocampo en los casos en que el paciente presenta epilepsia de larga evolución, lo cual sugiere que la esclerosis mesial es consecuencia de las crisis, argumento que ha perdido importancia, al encontrarse igual porcentaje de gliosis y pérdida neuronal en pacientes que tienen pocos o muchos años de epilepsia. Lo anterior hace sospechar un origen perinatal o quizás postnatal en la producción del daño hipocampal e indica que la esclerosis mesial es la causa y no la consecuencia de las crisis (McNamara, 1994; Engel, 1996).

#### **1.4.2.1.2 Lesión Ocupativa**

La ELT puede ser también consecuencia de tumores cerebrales (lesión neoplásica). Las lesiones tumorales más frecuentes asociadas a la epilepsia son los astrocitomas de bajo grado, oligodendrogliomas, gangliogliomas y tumores disembrionarios-neuroepiteliales (McNamara, 1994; Engel, 1996). Las lesiones no-neoplásicas son generalmente cavernomas, malformaciones artero-venosas, necrosis focales, quistes poro-encefálicos, las lesiones por falla de la migración celular durante el desarrollo embrionario, las cuales constituyen un importante grupo en este rubro (McNamara, 1994; Engel, 1996) y otras cicatrices cerebrales.

#### **1.4.2.2 Causas de ELT no asociadas con anomalías estructurales identificables**

En pacientes con ELT idiopática sin antecedentes de lesión cerebral temprana, se observa una menor pérdida neuronal asociada a un peor pronóstico posquirúrgico. Tras el daño inicial del hipocampo se produce una pérdida neuronal subsiguiente. Sin embargo, aún no es posible determinar que parte de la lesión en el hipocampo encontrada en pacientes con cirugía se debe a la lesión cerebral temprana y que parte corresponde a los cambios isquémicos secundarios (Mathern y cols., 1995).

### **1.4.2.3 Causas Genéticas de ELT**

La importancia de la genética en la epilepsia está confirmada por la existencia de varios síndromes epilépticos hereditarios en humanos, así como en modelos experimentales. Los hallazgos referentes a la ELT consisten en: alteraciones en el alelo de la apolipoproteína E- $\epsilon$ 4 (APOE- $\epsilon$ 4) asociándose con el inicio temprano de las crisis convulsivas (Mercier y Lucotte, 2000). Por otro lado, también se reporta una mutación en el gen humano LGI1 (gen 1 de glioma inactivado, rico en leucina) del cromosoma 10q23-24, la que causa ELT (Berkovic y cols., 2004; Gu y cols., 2005).

### **1.4.2.4 Causas Celulares de la ELT**

Existen alteraciones celulares asociadas con la ELT, entre las que destacan, el daño en la conductividad neuronal, específicamente alteraciones de los canales iónicos sensibles a voltaje o de los transportadores; anomalías en las funciones sinápticas inhibitorias o excitatorias tales como cambios en la síntesis, liberación, recaptura o acción postsináptica de los neurotransmisores; así como cambios de las conexiones sinápticas entre las células (Meldrum y cols., 1995).

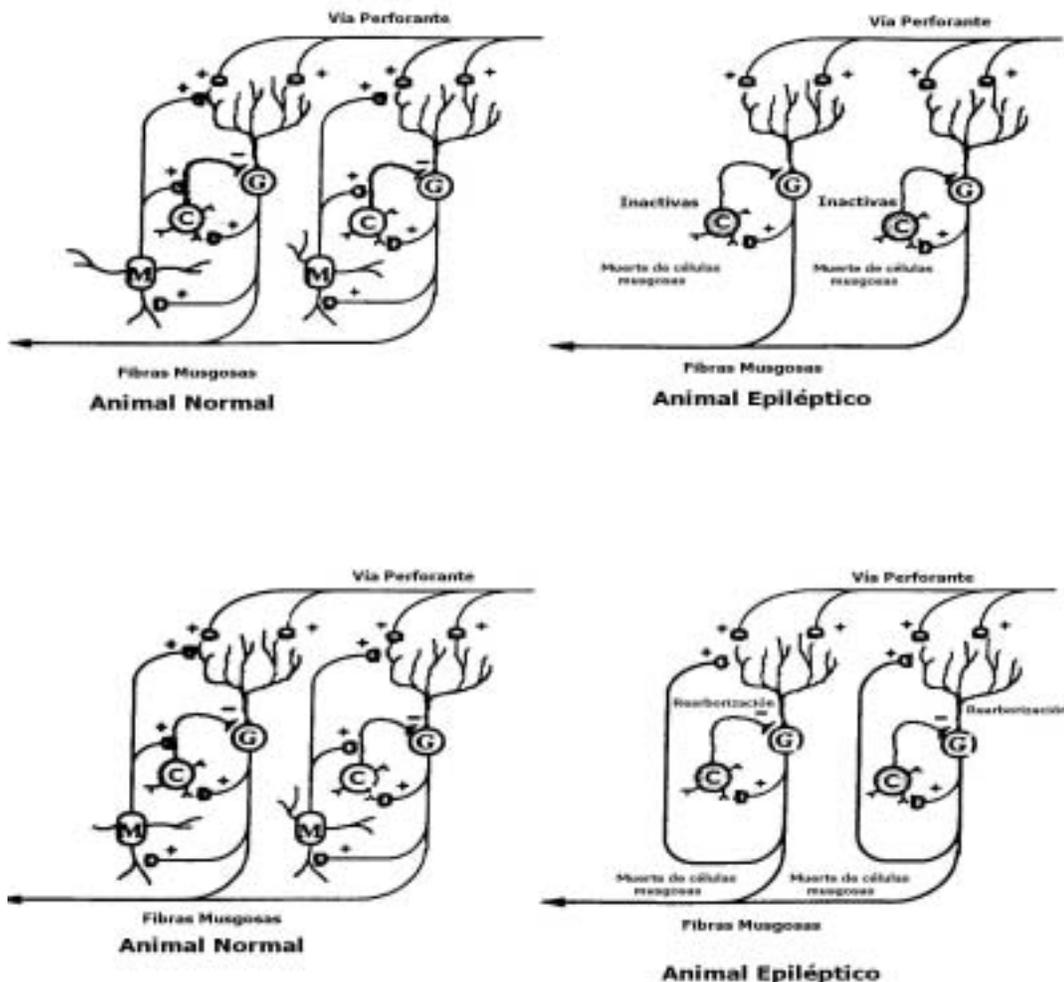
Se han propuesto dos mecanismos celulares que explican la fisiopatología de la ELT.

**a)** Hipótesis de células en canasta inactivas. Se sugiere que las crisis inducen la muerte de las células musgosas del hilus del hipocampo que son neuronas excitatorias; esto ocasiona que las células de canasta GABAérgicas no se activen, sumado a una actividad excitatoria que origina el disparo excesivo de las células granulares que progresa hasta la muerte celular concomitante a una actividad epiléptica latente (Sloviter, 1991; Figura 1).

**b)** Hipótesis de la rearborización de las fibras musgosas. Se propone que la hiperexcitabilidad de las células granulares es consecuencia de una reorganización de un circuito neuronal en el cual las células granulares excitatorias se inervan a ellas mismas, produciendo un circuito excitatorio recurrente (Nadler y cols., 1980; Tauck y Nadler, 1985; Figura 1).

**c)** Existen evidencias que indican que otras estructuras, además, del hipocampo participan en la generación y propagación de las crisis convulsivas (Piredda y Gale, 1985; Bernasconi y cols., 2005), entre las que se encuentran la corteza piriforme (Doherty y cols., 2000) y la corteza entorrinal que representa una región anatómica y

funcionalmente diferente al giro hipocampal anterior. Esta última está extensamente interconectada con áreas sensoriales neocorticales y asociaciones multimodales, así como con regiones subcorticales. Es la vía más directa de aferentes al hipocampo y recibe importantes conexiones de la amígdala (Insausti y cols., 1987; Van Hoesen y Pandya 1975). La corteza entorrinal presenta pérdida neuronal en la capa III en su porción anterior y una disminución en el grosor de la misma (Du y cols., 1993).



**Figura 1.** Hipótesis que explican el incremento de la excitabilidad de las células granulares en modelos experimentales de epilepsia. La parte superior izquierda describe el circuito de las fibras musgosas (M) que excitan a las células en canasta (C) y a las células granulares (G). La parte superior derecha describe la eliminación de la entrada excitatoria a las células en canasta, debido a la muerte de las células musgosas lo que resulta en una inactivación de las células en canasta e incremento de la excitación por las células granulares. El panel izquierdo de abajo describe el circuito normal, como en el panel superior izquierdo. El panel de abajo derecho describe la formación de sinápsis recurrentes excitatorias de las células granulares, las cuales se inervan a ellas mismas generando un circuito excitatorio recurrente (Modificado de Sloviter, 1991).

### **1.4.3 Hallazgos asociados a ELT**

#### **1.4.3.1 Imagen por Resonancia Magnética (IRM)**

La resonancia magnética es el resultado de los efectos de la variación de potentes campos magnéticos aplicados al tejido cerebral. Cuando se coloca en un campo magnético, se pueden hacer resonar a los núcleos de ciertos átomos por ejemplo los átomos de hidrógeno (protones), aplicándoles un pulso de radiofrecuencia (Turner y Jones, 2001). Con esto se obtienen imágenes de distintas estructuras cerebrales ya que los protones tienen propiedades diferentes. Además se pueden diferenciar los protones de diferentes estructuras en base a dos parámetros de relajación T1 y T2 asociados a conductas distintas de los protones (Turner y Jones, 2001).

En los estudios de IRM se muestra el daño que ocasiona la ELT tanto unilateral como bilateralmente en diferentes estructuras como la amígdala, el

hipocampo, la región parahipocampal, la corteza perirrinal y entorrinal; dicho daño consiste en una reducción del volumen de estas estructuras implicadas en la extensión y propagación de la crisis (Bernasconi y cols., 1999, 2003; Salmenpera y cols., 2000; Pitkanen y cols., 1998). El tiempo de relajación T2 es otra medida que se obtiene con IRM que se usa para localizar cambios estructurales en el cerebro epiléptico. Van Paesshen y cols., 1996 investigaron el tiempo de relajación en 82 pacientes con ELT y hallaron que el 54% tenía una amígdala anormal. Sin embargo, se describe que pacientes con IRM normal, pueden lateralizar el tiempo de relajación T2 en la ELT (Bernasconi y cols., 2000).

#### **1.4.3.2 Aminoácidos excitatorios en la ELT**

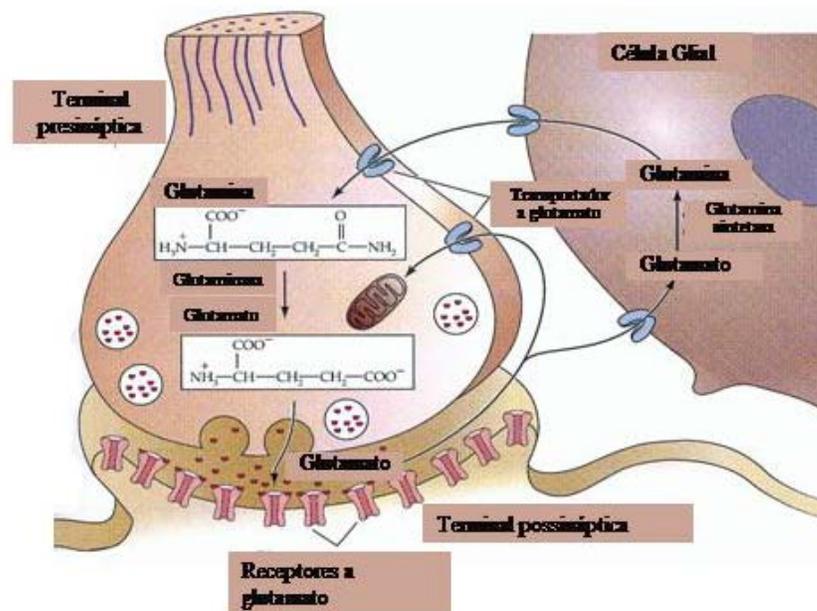
El glutamato es el principal neurotransmisor que media la respuesta sináptica excitatoria en el SNC (Collingridge and Lester, 1989). El glutamato es un aminoácido no esencial, no cruza la barrera hematoencefálica y puede ser sintetizado en las neuronas de precursores locales. El esqueleto de carbono de este aminoácido deriva del metabolismo oxidativo de la glucosa. Este proceso involucra la formación de piruvato a partir de la glucosa, el cual es transformado a acetil-coenzima A, el que entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Uno de los participantes de este ciclo es el  $\alpha$ -cetoglutarato, el cual se convierte a glutamato por medio de una transaminación (Augustine, 2001). La enzima aminotransferasa transporta un grupo amino de un donador a un aceptor el  $\alpha$ -cetoglutarato formandose una molécula de glutamato. Esta enzima requiere de un cofactor, el fosfato de piridoxal, el cual se deriva de la vitamina B6. Otro mecanismo por el

cual se forma glutamato es a partir del precursor más abundante, la glutamina, que se encuentra dentro de las terminales nerviosas. La glutamina es liberada por las células gliales y una vez en las terminales presinápticas es metabolizada por la enzima mitocondrial glutaminasa a glutamato (Augustine, 2001, Figura 2).

Los receptores a glutamato comprenden dos familias: Los receptores ionotrópicos y los metabótrópicos. Su activación produce la despolarización de la célula posináptica generando el disparo de la neurona (Figura 3).

Hay tres clases de receptores ionotrópicos al glutamato.

- a) Receptor AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propionico). Su activación produce entrada de iones  $\text{Na}^+$  y salida de  $\text{K}^+$ , y en la mayoría de los casos es impermeable al  $\text{Ca}^{++}$ .
- b) Receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) con permeabilidad a iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$



y salida de  $\text{K}^+$ .

Figura 2. Síntesis y metabolismo del glutamato. Modificado de Purves 2001.

- c) Receptor Kainato ionotrópico, su activación produce entrada de iones  $\text{Na}^+$  y salida de  $\text{K}^+$  (Augustine, 2001. Figura 3).

Los receptores metabótrópicos o no-NMDA están acoplados a una proteína G. Su activación produce una cascada de segundos mensajeros y se caracterizan por tener 7 dominios transmembranales. Los estudios genéticos indican la existencia de tres grupos de receptores metabotrópicos con base en la similitud de la secuencia de aminoácidos, a su farmacología y al acoplamiento a segundos mensajeros (Figura 3).

- a) El grupo que incluye a los mGluR1 y el mGluR5 está acoplado positivamente al sistema de segundos mensajeros del fosfoinositol.
- b) El grupo que está constituido por el mGluR2 y el mGluR3 que inhibe la formación de AMPc cuando se activan.

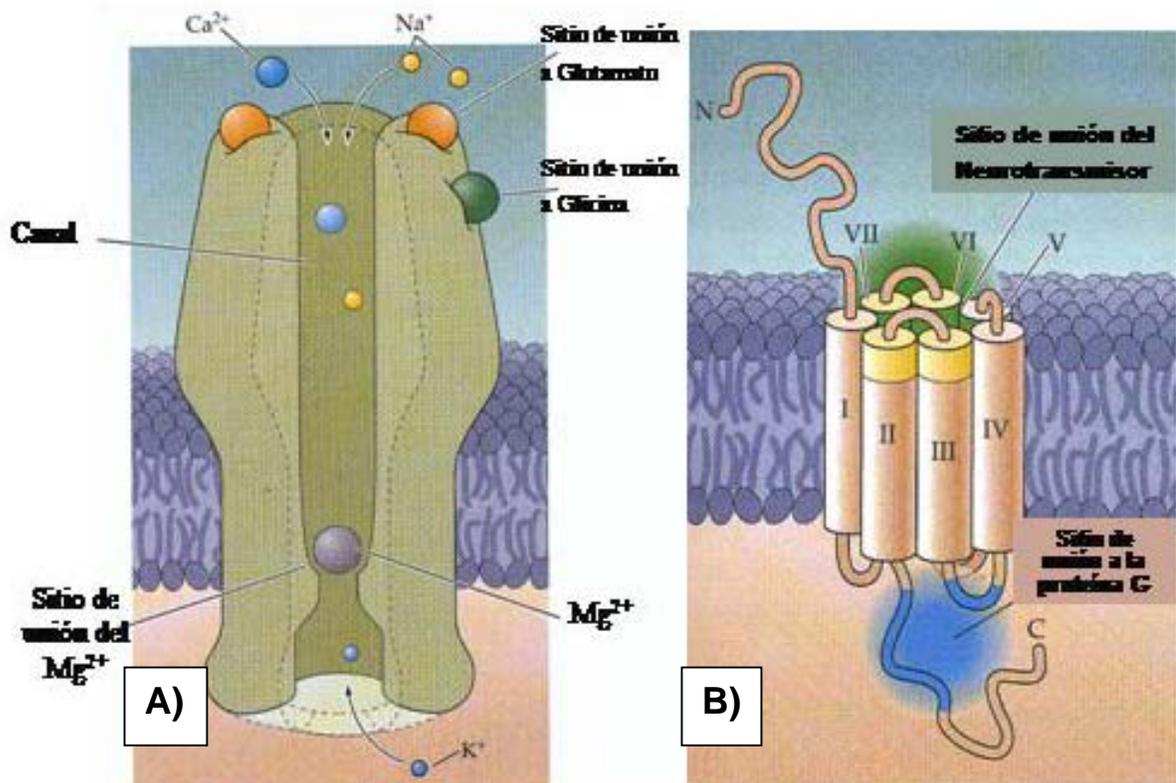


Figura 3. Características del receptor ionotrópico (A) y del receptor metabotrópico (B), modificado de Purves 2001.

c) Los receptores mGluR4, mGluR6, mGluR7 y el mGluR8 están acoplados negativamente a la adenilato ciclasa (Augustine, 2001)

Durante la fase ictal en el hipocampo (foco epiléptico) de pacientes con ELT existe un incremento del glutamato antes y durante la fase ictal (Perry y Hansen, 1981; Sherwin y cols., 1988). Esto puede conducir a una activación de sus receptores y causar una hiperexcitabilidad y la muerte debido a la alta concentración de este aminoácido (Choi, 1992).

El lóbulo temporal con actividad epiléptica presenta un incremento del contenido tisular de glutamato, aspartato y glicina (Perry y Hansen, 1981, Sherwin y cols., 1988).

Por medio de la técnica de autorradiografía se sabe que los niveles de receptores NMDA y kainato se elevan en el giro parahipocampal y en la corteza entorhinal de pacientes con ELT (Geddes y cols., 1990; Cahan y cols., 1990). No obstante, en el hipocampo, la densidad de unión del ligando a los receptores está disminuida en las regiones con esclerosis como CA3, hilus y CA1 debido a la pérdida neuronal, mientras que en el subiculum y la capa molecular del giro dentado no hay cambios (Geddes y cols., 1990; Cahan y cols., 1990). Estudios de hibridación *in situ* indican que en pacientes con ELT crónica existe en el giro dentado un incremento del ARNm de la subunidad GluR2 del receptor AMPA y de la subunidad NR2 del receptor NMDA (Mathern y cols., 1997).

#### **1.4.3.3 GABA en la ELT**

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC realizando su función manteniendo un balance con la excitación neuronal (Treiman, 2001).

El precursor predominante para la síntesis del GABA es la glucosa, la que es metabolizada a glutamato por las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico o ciclo de Krebs, aunque el piruvato y la glutamina pueden también actuar como precursores. El glutamato es catalizado por la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), la cual se encuentra casi exclusivamente en las neuronas GABAérgicas. El cofactor de la GAD es el fosfato de piridoxal. En el catabolismo del GABA participa la enzima GABA aminotransferasa (GABA-T), la que requiere también del fosfato de piridoxal. La GABA-T transfiere al grupo amino del GABA al  $\alpha$ -cetoglutarato lo que produce el semialdehído succínico. Este a su vez se oxida a

succinato por la acción de la enzima mitocondrial semialdehído succínico deshidrogenada (Augustine, 2001).

El GABA se une a tres diferentes tipos de receptores que se localizan en las membranas de células nerviosas: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> y GABA<sub>C</sub>. El receptor GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> son receptores ionotrópicos unidos a un canal de cloro (Cl<sup>-</sup>), mientras que el receptor GABA<sub>B</sub> es metabotrópico unido a proteínas G. El receptor GABA<sub>A</sub> es el de

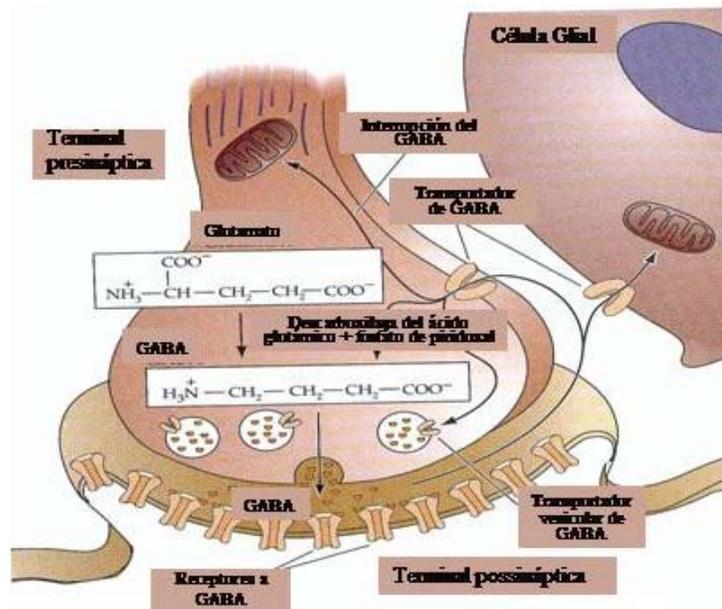


Figura 4. Síntesis y metabolismo del GABA. Modificado de Purves 2001.

mayor abundancia en el SNC de los mamíferos. Su activación induce la apertura del canal de cloro (Cl<sup>-</sup>), seguida de entrada de Cl<sup>-</sup> a través de la membrana. Esto conduce a la hiperpolarización de la célula

possináptica inhibiendo el disparo de la neurona. Existen varios sitios de acción que modulan la función del receptor GABA<sub>A</sub>. Estos son los sitios para GABA, picrotoxina, barbitúricos, benzodiazepinas (BDZ) y esteroides (Augustine, 2001). Al igual que otros receptores ionotrópicos, el receptor GABA<sub>A</sub> es un pentámero ensamblado con una combinación de 5 tipos de subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\rho$ ). Como un resultado de esta diversidad de subunidades, la conformación del receptor GABA<sub>A</sub> difiere ampliamente entre las neuronas (Augustine, 2001)

Existe evidencia que apoya que la generación de las crisis epilépticas está asociada a alteraciones en el sistema GABAérgico (Olsen y Avoli, 1997; Treiman, 2001). Las benzodicepinas (BDZ) son

una clase de agentes terapéuticos que son

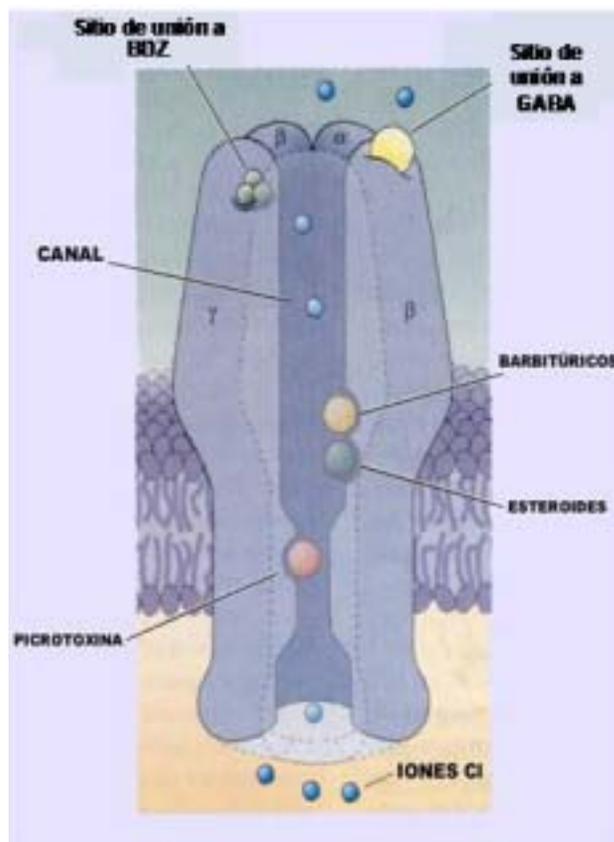


Figura 5. Características del receptor ionotrópico GABA<sub>A</sub> y sus diferentes sitios de unión. Modificado de Purves y col., 2001.

ampliamente usados como ansiolíticos, sedantes, hipnóticos y anticonvulsivantes. Estas drogas ejercen su efecto al unirse a sitios en el receptor GABA<sub>A</sub> lo que modula la capacidad del neurotransmisor GABA para abrir el canal de cloro (Bonnert y cols., 1999; Kandel y Siegelbaum, 2001)

Durante el período ictal, la liberación de GABA se incrementa en el hipocampo de pacientes con ELT, mientras que durante el período interictal hay

una disminución del mismo (During y Spencer, 1993; During y cols., 1995; Wilson y cols., 1996). Estos resultados sugieren que la activación del GABA por la epilepsia puede estar involucrada en la supresión de las crisis convulsivas durante el ictus.

En el hipocampo de pacientes con ELT se observa una hiperinervación de las terminales del GABA, que compensa el decremento de la enzima asociada al daño neuronal, lo que explica la ausencia de cambios aparentes (Babb y cols., 1989; Mathern y cols., 1995).

No obstante lo anterior, aún existe controversia acerca del contenido tisular del GABA en pacientes con ELT. Por una parte hay evidencias que muestran una disminución del contenido tisular de GABA en el tejido de pacientes con ELT (Perry y Hansen, 1981). Y por otro lado se observa un aumento de los niveles tisulares de GABA en el lóbulo temporal (Sherwin y cols., 1988). Esta discordancia de resultados puede deberse a las diferentes metodologías usadas para determinar GABA, así como a las características del tejido control (Bradford, 1995).

En cuanto a los receptores a  $GABA_A$ , existe una reducción del complejo  $GABA_A$ -BDZ en el hipocampo de pacientes con ELT, lo cual se asocia a daño en las neuronas de esta región (Savic y cols., 1988; McDonald y cols., 1991; Burtette y cols., 1995; Koeppe y cols., 1997;

Sata y cols., 2002). Se ha observado que en la neocorteza temporal lateral hay un aumento en el sitio de unión a BDZ, principalmente en las capas corticales internas (Burdette y cols., 1995), lo cual sugiere que la neocorteza, al presentar un incremento en los niveles de unión a BDZ, limita la propagación de la actividad epiléptica a otras áreas cerebrales.

En relación a las diferentes subunidades que forman el receptor GABA<sub>A</sub>, se describe que el tejido obtenido en cirugía terapéutica de epilepsia, se microtransplantó en oocitos de *Xenopus*. Los resultados obtenidos en el área CA1 esclerótica presentaron una disminución en la inmunorreactividad de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$  y  $\gamma 2$  (Pirker y cols., 2003). En la formación hipocampal, tanto en tejido esclerótico como en no esclerótico, así como en la capa molecular dentada, presentan un aumento significativo de su inmunoreactividad en las 3 subunidades  $\beta$ , el subiculum también muestra una elevación de la inmunoreactividad de las subunidades  $\alpha 3$  y  $\gamma 2$  (Pirker y cols., 2003). La expresión del ARNm de las subunidades  $\beta 2$  y  $\beta 3$  se encuentra aumentada significativamente en las células granulares dentadas de pacientes con y sin esclerosis hipocampal (Pirker y cols., 2003). Por otro lado, se ha observado en el tejido cerebral resecado de pacientes con ELT y de la

neocorteza, un aumento en la expresión del ARNm de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  a  $\beta 5$  con la excepción de la subunidad  $\gamma 2$  que se expresa en menor cantidad, además de que el receptor GABA<sub>A</sub> presenta una baja afinidad por el GABA, así como una corriente invertida que genera un potencial depolarizante (Palma y cols., 2004). Una composición alterada de las subunidades  $\beta 3$  o una mutación en la subunidad  $\gamma 2$  del receptor GABA<sub>A</sub>, causan epilepsia (DeLorey y cols., 1998; Harkin y cols., 2002).

#### **1.4.4 Tratamiento de la ELT**

##### **1.4.4.1 Tratamiento farmacológico de la ELT**

El objetivo del tratamiento farmacológico es evitar con drogas antiepilépticas la aparición de las crisis convulsivas en los pacientes epilépticos, sin interferir con su vida normal y sin efectos adversos. Por ello, es necesario conocer el tipo de crisis epiléptica que presenta el paciente, así como el mecanismo de acción del fármaco para un mejor control de las crisis convulsivas. En la Tabla 3 se muestran los fármacos antiepilépticos más utilizados para su tratamiento (Rall y Schleifer, 1990; Dichter, 1994; Capek, 1997).

El mecanismo de acción de los fármacos antiepilépticos se divide en tres grupos:

- 1) Bloqueo de canales dependientes de voltaje, entre los que se encuentran los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T. Estos últimos son activados con bajo voltaje y se encuentran implicados en el mecanismo anticonvulsivante. El bloqueo de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  evita la generación del potencial de acción (Rall y Schleifer, 1990; Dichter, 1994; Capek, 1997).
- 2) Disminución de la transmisión excitatoria la cual puede ocurrir pre-sinápticamente por inhibir la liberación del excitador (glutamato), o bien postsinápticamente por bloqueo de sus receptores (NMDA y no-NMDA) (Rall y Schleifer, 1990; Dichter, 1994; Capek, 1997).
- 3) Incremento de la neurotransmisión inhibitoria mediada por GABA, la cual ocurre por un aumento de su liberación, de su síntesis y de su acción en el receptor  $\text{GABA}_A$  o bien por bloqueo de su degradación y recaptura (Rall y Schleifer, 1990; Dichter, 1994; Capek, 1997).

## Tabla II. Fármacos Antiepilépticos más usados en la clínica.

Adaptado de Rall y Schleifer, 1990;

| Fármaco antiepiléptico   | Mecanismo de acción   | Tipo de crisis epiléptica  |
|--|---|--|
| <b>Carbamazepina</b><br>(Fármaco de primera elección tratamiento de ELT) | Bloqueo de canales de Na <sup>+</sup>   | Crisis parciales; Crisis tónico-clónicas   |
| <b>Fenitoína</b>   | Bloqueo de canales de Na <sup>+</sup>   | Crisis parciales; Crisis tónico-clónicas   |
| <b>Primidona</b>   | Actúa sobre el sitio de unión a barbitúricos en el receptor GABA <sub>A</sub>                                 | Crisis Parciales; Crisis tónico-clónicas   |
| <b>Ácido Valproico</b><br>(Fármaco de primera elección tratamiento ELT)  | Bloqueo de canales de Na <sup>+</sup><br>Aumento de la transmisión GABAérgica                                 | Crisis parciales; Crisis tónico-clónicas; Crisis de ausencia; Crisis mioclónicas |
| <b>Gabapentina</b>   | Bloqueo de canales de Ca <sup>2+</sup><br>Aumento de la transmisión GABAérgica y otros posibles mecanismos    | Crisis parciales; Crisis tónico-clónicas   |
| <b>Lamotrigina</b><br>(Fármaco de segunda elección tratamiento ELT)      | Bloqueo de canales de Na <sup>+</sup>   | Crisis parciales; Crisis de ausencia   |
| <b>Fenobarbital</b>  | Actúa sobre el sitio de unión a barbitúricos en el receptor GABA <sub>A</sub>                                 | Crisis parciales; Crisis tónico-clónicas   |
| <b>Felbamato</b>   | Bloqueo de canales de Na <sup>+</sup><br>Aumento de la transmisión GABAérgica. Antagonista de receptores NMDA | Crisis parciales   |
| <b>Topiramato</b><br>(Fármaco de segunda elección tratamiento ELT)       | Bloqueo de canales de Na <sup>+</sup><br>Aumento de la transmisión GABAérgica                                 | Crisis parciales   |
| <b>Clonazepam</b>  | Actúa sobre el sitio de unión a benzodiazepinas en el receptor GABA <sub>A</sub>                              | Crisis ausencia; Crisis mioclónicas  |
| <b>Etosuximida</b>   | Bloqueo de canales de Ca <sup>2+</sup>  | Crisis de ausencia   |

#### **1.4.4.2 Tratamiento quirúrgico de la ELT**

Del 16 al 30% de los pacientes epilépticos son refractarios al tratamiento farmacológico (Jallon, 1997). Juul-Jensen (1986) define a la ELT resistente a medicamentos como la presencia de crisis repetidas por dos años o más en pacientes que están recibiendo un tratamiento apropiado de medicamentos antiepilépticos. Aunque a la fecha no se sabe por qué y cómo la epilepsia llega a convertirse en un trastorno farmacológicamente intratable. Se ha sugerido como posibles factores predisponentes a la refractoriedad, la edad de inicio de las crisis entre más jóvenes es peor el pronóstico, el tiempo prolongado sin recibir tratamiento con antiepilépticos, una alta frecuencia de crisis convulsivas, antecedentes de crisis febriles, tipo y persistencia de las mismas, sufrimiento de estado epiléptico, estado neurológico anormal e historia familiar de epilepsia entre otros. Otros posibles factores biológicos que participan en la refractoriedad son los procesos inflamatorios, neoplásicos y metabólicos (Regesta y cols., 1997).

La lobectomía temporal elimina o disminuye el número de crisis convulsivas del lóbulo temporal y se recomienda cuando existe un solo foco epiléptico. Se cuenta con varias técnicas quirúrgicas de acuerdo

al área a resecar. En la lobectomía temporal anterior del lóbulo temporal no dominante se resecan 6 a 6.5 cm., y en el lóbulo temporal dominante de 4 a 4.5 cm. de la corteza temporal por debajo del giro temporal medio, así como resección de 1 a 3 cm del hipocampo anterior (Wiebe y cols., 2001).

En los casos de focos mesotemporales, se eliminan solamente las estructuras temporales mesiales, esto evita la resección neocortical extensa. En la amigdalohipocampectomía realizada por Yasargil, se abre la cisura de Silvio y sólo se reseca la amígdala anterolateral, el hipocampo anterior y el giro parahipocampal (Yasargil y cols., 1985).

## **1.5 “Kindling” y AK como modelos experimentales de ELT**

### **1.5.1 “Kindling”**

El “kindling” eléctrico amigdalino consiste en la aplicación de estímulos repetidos, inicialmente subumbrales, que producen cambios conductuales y electrográficos progresivos que culminan en crisis generalizadas. La fase “kindled” es cuando se producen tres crisis generalizadas continuas y se considera que el animal es epiléptico, ya que presentan cambios plásticos permanentes que lo hacen

susceptible a presentar crisis generalizadas cada vez que recibe un estímulo tipo “kindling” (Goddard y cols., 1969).

Los cambios conductuales asociados al desarrollo del “kindling” en la rata, consisten en: Fase I, guiño del ojo ipsilateral al sitio de estimulación, Fase II, fase I más movimientos de cabeza y masticación, Fase III, fase II más mioclonias de miembros anteriores, Fase IV, fase III más postura de canguro, Fase V, fase IV más pérdida de tono postural y crisis convulsiva generalizada (Racine, 1972).

El “kindling” es un modelo de ELT ya que reproduce algunos cambios conductuales y electrográficos; primero, el patrón asociado a este trastorno conductual de la fase “kindled” o fase V es semejante a las crisis parciales complejas en el humano con crisis tónico-clónicas secundariamente generalizadas; segundo, las anomalías electroencefalográficas durante la fase “kindled” son similares a los registros de electrodos en la amígdala y la formación hipocampal durante las crisis parciales complejas en humanos; y tercero, existe una estrecha correspondencia entre los anticonvulsivantes que son efectivos contra las crisis por “kindling” y humanas (McNamara, 1986).

En ratas a las que se les aplica “kindling” y llegan a crisis espontáneas, no muestran daño neuronal en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo, la amígdala, la región parahipocampal y el tálamo; además el número total de neuronas hilares y

del volumen hilar indica que la reducción en la densidad neuronal en el hilus dentado se debe a la expansión del área hilar, pero no al daño neuronal, por lo que estos datos carecen de una clara asociación entre las crisis espontáneas y el daño (Brandt y cols., 2004).

### **1.5.1.1 Características del modelo "kindling"**

#### **1.5.1.1.1 Aminoácidos excitatorios y "kindling"**

En el "kindling" se reporta un aumento del contenido tisular del glutamato hipocampal cinco minutos después del estímulo, en la fase 3 se presenta un incremento del mismo y de igual manera en la fase 5 del "kindling" (Ueda y Tsuru, 1995). En relación a la liberación, en una cepa de ratas de respuesta genéticamente rápida al "kindling" se obtiene una elevación del glutamato en la amígdala ipsilateral (Shin y cols., 2004). Además también existe un incremento del glutamato en el hipocampo en las fases 2, 3 y en el animal kindled cuando se compara con su control, sin embargo el aspartato se encuentra disminuido (Minamoto y cols., 1992).

En cuanto a los receptores excitatorios, específicamente el receptor NMDA en animales kindled no presenta cambios significativos en las estructuras del hipocampo y del estriado 48 h después de alcanzar el estado 1 o 2, 3 o 5 del "kindling" (Vezzani y cols. 1990). Sin

embargo, se ha reportado en el giro dentado un aumento del receptor NMDA 48 h después de la última crisis kindled (Behr y cols., 2000). En cuanto a las subunidades se muestra que el “kindling” induce una reducción en la corteza piriforme de la subunidad GluR2 del receptor AMPA, 24 h después de la última fase 5 del “kindling” (Prince y cols., 1995). También se muestra que en el giro dentado el ARNm de la subunidad NR1 del receptor NMDA en animales parcialmente kindled permanece sin cambio después de 2 h, mientras que el ARNm de la subunidad NR2A y NR2B presentan una reducción bilateral y en animales con fase V se demuestra una reducción progresiva en el ARNm de la subunidad NR1 siendo máxima después de 4 h, al mismo tiempo los niveles de las subunidades NR2A y NR2B presentan un aumento transitorio, al compararlo con sus controles (Pratt y cols., 1993).

#### **1.5.1.1.2 GABA y “kindling”**

En el hipocampo, después del estímulo el GABA presenta un incremento gradual que permanece 20 min después, así mismo, en la fase 3 y en la 5 del “kindling” se muestra un aumento (Ueda y Tsuru, 1995). Con respecto al sistema gabaérgico, el “kindling” aumenta los niveles de los receptores a GABA y a BDZ en el giro dentado del hipocampo 24 h después de presentar la última crisis

convulsiva generalizada fase V del estado “kindled”, efecto que no se detecta 28 días después de la misma (Nobrega, 1989; Shin y cols., 1985). En cuanto a la liberación en el hipocampo de ratas que alcanzan la fase 2 y 3 del “kindling” se presenta un aumento y de igual manera en la fase “kindled”, al compararlo con el control (Minamoto y cols., 1992).

En relación al sitio de unión de las BDZ por el [<sup>3</sup>H]flunitracepam mediante autoradiografía, se reporta que 24 h después de la última crisis tónico-clónica generalizada, en el área CA1 en concentraciones de 3 y 16 nM, hay una disminución significativa de la unión del [<sup>3</sup>H]flunitracepam y 28 días después, está misma área presenta un aumento en la unión en la concentración de 3 nM, mientras que en la fascia dentada 24 h y 28 días después de la última crisis kindled se muestra un aumento significativo de la unión en ambas concentraciones (Titulaer y cols., 1995). En cuanto al complejo GABA<sub>A</sub>, el [<sup>3</sup>H]Muscimol en su sitio de unión, en el “kindling” hipocampal induce 24 h después de la última crisis kindled en el área CA1 una disminución significativa en el sitio de alta e intermedia afinidad, así como en el de baja afinidad y en la fascia dentada un aumento significativo en los sitios de unión de alta/intermedia y en el de baja afinidad en comparación con sus controles, mientras que 28 días después de la última crisis en el área CA1 persiste la disminución en la unión de baja afinidad, así como en la unión de alta e intermedia afinidad, en la capa granular y molecular de la fascia dentada donde hay un aumento en la unión de intermedia y alta afinidad y el de baja afinidad retorna a los niveles del control (Titulaer y cols., 1994).

En una cepa de rata de “kindling” rápido, se observa un aumento en la expresión del ARNm de la subunidad  $\alpha 1$  del cerebro adulto de las subunidades del

receptor GABA<sub>A</sub>, mientras que en la cepa de “kindling” lento se halla un decremento, la sobreexpresión de las subunidades  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 5$  expresadas en el cerebro en desarrollo, lo que se confirma con inmunoblot e inmunohistoquímica, también hay una disminución de las proteínas al compararse con los controles o con la cepa de “kindling” lento (Poulter y cols., 1999).

### **1.5.2 Acido Kaínico**

El ácido kaínico (AK) es un modelo experimental de ELT, porque presenta cambios semejantes a la esclerosis mesial, específica de la ELT en humanos. Primero en el animal se observan crisis complejas parciales o *status epilepticus* convulsivo generalizado y posteriormente crisis espontáneas recurrentes. Segundo en el animal se presenta una disminución del tejido, pérdida celular y gliosis en todos los subcampos del hipocampo, (Nadler, 1979; Pisa y cols., 1980).

Las consecuencias histopatológicas de la administración del ácido kaínico se evaluaron en diferentes etapas del desarrollo, en animales de menos de 18 días de edad no se observa señal de daño, entre 18 y 35 días se presenta un aumento progresivo de la severidad del daño y en animales adultos el daño que se observa fue muy severo; las estructuras que presentan mayor daño son la formación hipocampal, el septum lateral, el complejo de la amígdala, el claustrum y la corteza piriforme (Nitecka y cols., 1984).

### **1.5.2.1 Características del modelo de AK**

#### **1.5.2.1.1 Aminoácidos excitatorios y AK**

Los resultados que se obtienen en cuanto al contenido tisular del glutamato se hallan en controversia, por un lado: Las crisis convulsivas que se inducen con AK producen un aumento de este aminoácido en el área CA3, mientras que el área CA1 muestra una disminución (Ding y cols., 1998). Otros autores reportan en CA3 una disminución significativa tanto del glutamato como del aspartato, durante el curso del síndrome de sacudida de perro mojado, 30 a 45 min después de la inyección de AK. Aproximadamente, 55 a 75 min después de la aplicación del AK se detecta una disminución significativa de la concentración del glutamato, aspartato, glicina, taurina y glutamina. Finalmente los niveles regresan al estado basal tanto la glutamina, taurina y glicina, así como un aumento significativo en la concentración de GABA, mientras que la disminución significativa en el glutamato y el aspartato persiste (Nicolletti y cols., 1984).

En relación a la liberación del glutamato y del aspartato se reporta que la formación hipocampal presenta un aumento del [<sup>3</sup>H] D-aspartato acompañado por un aumento del glutamato a nivel extracelular (Bruhn y cols., 1997).

En los receptores a glutamato se reporta en el hipocampo de animales tratados con AK un aumento en la subunidad GluR5 y de las proteínas a las 72h y permanece elevado hasta los 180 días; el ARNm de la subunidad GluR7 muestra una disminución significativa a los 90 días después de las crisis (Ullal y cols., 2005).

#### **1.5.2.1.2 GABA y AK**

En lo que se refiere a la liberación del GABA, en la amígdala de rata, se reporta un aumento (Bruhn y cols., 1997). En el hipocampo de ratas tratadas con AK, los receptores GABA<sub>A</sub> disminuyen probablemente por el daño neuronal. Sin embargo, este efecto en los receptores puede en parte estar compensado por un aumento en la expresión de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> en la capa molecular del giro dentado y en las células piramidales (Schwarzer y cols., 1997)

Por otra parte, se sabe que 24 h después de la administración de AK se muestra un aumento en la unión de las BDZ al receptor GABA<sub>A</sub> en la corteza piriforme, y una disminución de la unión en el núcleo amigdalino anterior, los campos CA1 y CA3 del hipocampo y el giro dentado, 40 días después del *status epilepticus*, la unión de las BDZ al receptor se encuentra disminuida en el núcleo talámico medial, se incrementa en la sustancia gris periaqueductal dorsolateral y en el giro dentado del hipocampo (Rocha y Ondarza, 1999). Este último efecto es similar al que se observa 24 h después de la última fase V del “kindling” eléctrico amigdalino (Shin y cols., 1985).

Los cambios producidos por la epilepsia en el cerebro en desarrollo difieren de lo que se observa en animales adultos. Al respecto, se describe que en el cerebro en desarrollo, el ácido kaínico produce un aumento de la unión de las BDZ al receptor GABA<sub>A</sub> en la

corteza frontal, parietal posterior, piriforme, entorhinal, los núcleos amigdalinos medial y basolateral, el giro dentado y la sustancia *nigra pars reticulata* (Rocha y cols., 2000).

## **1.6 Crisis febriles**

### **1.6.1 Crisis febriles en el cerebro inmaduro como causa de ELT**

El cerebro inmaduro es más susceptible a las crisis convulsivas, pero más resistente al daño que se produce como consecuencia de ellas (Liebregts y cols., 2002; Liu y cols., 1996; Moshé y cols., 2000; Sperber y cols., 1999). Aunque algunos datos muestran que las crisis convulsivas en etapas tempranas de la vida reducen el crecimiento cerebral, no hay datos que apoyen que las crisis breves dañen estructuralmente al cerebro inmaduro (Holmes y cols., 1997).

La respuesta del cerebro inmaduro a la actividad convulsiva es variable. Por ejemplo, los animales inmaduros (7 y 12 días de edad) pretratados con 2-amino-7-fosfonoheptanoato (AP7) un anticonvulsivante, presentan un aumento a la incidencia de las crisis tónico-clónicas probablemente debido a su respuesta excitatoria en esta etapa de la vida, aunque en un período posterior (18, 25 y 90 días de edad) no influye en la incidencia de las crisis tónico-clónicas (Velisek y cols., 1990). En la mayoría de los modelos de crisis convulsivas en ratas con desarrollo normal, el estado epiléptico no induce pérdida celular, reorganización en el giro dentado o cambios en el área CA3, modificaciones que se observan en el cerebro maduro, después de las crisis (Holmes, 1997).

Las crisis febriles son muy frecuentes en etapas tempranas de la vida. Se clasifican dentro de los síndromes especiales (Commission on Clasification, 1989), y se definen como convulsiones en la niñez, que generalmente ocurren entre los 3 meses y los 5 años de edad, asociadas con hipertermia, pero sin evidencia de infección intracraneal y sin antecedentes de haber presentado convulsiones previas (Consensus Development Panel, 1981).

Existen evidencias que indican que las crisis febriles en la infancia predisponen a la esclerosis mesial temporal y a la ELT en adultos. Un análisis epidemiológico muestra una elevada prevalencia de antecedentes de crisis febriles durante la infancia (30-40 %) en individuos adultos con ELT (Cendes y cols., 1993; Harvey y cols., 1995). Algunos autores sugieren la participación de un daño neuronal preexistente o una alteración genética como iniciadores de las crisis febriles y posteriormente de la ELT (Barr y cols., 1997; VanLandingham y cols., 1998; Trinka y cols 2002). Por otra parte, otros estudios indican que las crisis febriles no progresan hacia ELT (Falconer y cols., 1964; Nelson y cols., 1976; Knudsen y cols., 1996; Bower y cols., 2000). Las evidencias antes descritas sugieren la necesidad de investigar los factores asociados a las crisis hipertérmicas que pueden predisponer a la ELT.

### **1.6.2 Métodos Experimentales para inducir Crisis Hipertérmicas (CH)**

Es posible inducir crisis por hipertermia en la rata inmadura (Holtzman y cols., 198; Hjeresen y Díaz, 1988; Morimoto y cols., 1991, 1993; Baram y cols., 1997), las cuales se han utilizado como modelo para el estudio de la patogénesis

de las crisis febriles y sus consecuencias en el cerebro inmaduro. A continuación se describen los siguientes métodos:

#### **1.6.2.1 Método con luz infrarroja**

Los animales se colocan en una cámara de lucita y a una distancia de 10 cm se enciende una lámpara de luz infrarroja de 250 watts hasta que se producen las crisis convulsivas. Se mide la temperatura rectal, así como la cerebral. El intervalo de temperatura es de 32 a 46°C. Las ratas presentan crisis clónicas y generalizadas, dependiendo de la temperatura (Holtzman y cols., 1981)

#### **1.6.2.2 Método con microondas**

Los animales se colocan en una cámara con un generador de microondas de 918 MHz acoplado a dos cámaras circulares con guías de onda polarizada, para ser irradiados. Las ventajas de este modelo son que la edad a la que se realiza (10 y 17 días) corresponde a la edad infantil humana a la que son susceptibles a las crisis febriles, y que las crisis hipertérmicas inducidas con microondas no afecta el peso corporal, la capacidad de aprendizaje ni la susceptibilidad a las crisis audiogénicas (Hjeresen y Díaz, 1988).

### **1.6.2.3 Método con aire caliente**

Las ratas previamente implantadas con electrodos de acero inoxidable se colocan en una caja de acrílico protegida eléctricamente. Los animales en libre movimiento, reciben una corriente de aire caliente regulada entre los 45 y 47°C. A través de los electrodos se evalúa la temperatura anal y el EEG (Fukuda y cols., 1997; Morimoto y cols., 1991, 1993).

Las desventajas de estos tres métodos son las siguientes: Primero, la temperatura del ambiente es elevada, segundo la temperatura corporal no se puede regular, tercero tanto la magnitud como la duración de las crisis no pueden ser controladas.

### **1.6.2.4 Inducción de CH por el método de Baram**

Baram y cols., describieron la producción de CH prolongadas (20 min) al aplicar una corriente de aire moderadamente caliente. Este método tiene las siguientes ventajas, la duración y magnitud así como la producción de las crisis convulsivas pueden ser reguladas y la reproducibilidad en este modelo es del 98 %, presenta poca mortalidad inducida por las crisis y por la hipertermia. Las crisis convulsivas se caracterizan por movimientos de succión, crisis tónicas, hay flexión unilateral del cuerpo así como de extremidades, ocasionalmente movimientos clónicos o de nado. (Baram y cols., 1997, Toth y cols., 1998; Chen y cols., 1999).

Usando este modelo se demuestra que un número significativo de neuronas en el hipocampo y en la amígdala se tornan argirofílicas dos semanas después de las CH, efecto que no se detecta 4 semanas después de las mismas, además de que pocas neuronas manifiestan cambios apoptóticos (Toth y cols., 1998). Las CH por este método producen un aumento de larga duración de la transmisión presináptica inhibitoria en el hipocampo, la cual es dependiente de la activación de la proteína cinasa A (PKA) en el estado adulto (Chen y cols., 1999). Las ratas que experimentan CH con este método, a la edad de 10 días no muestran crisis espontáneas en el estado adulto, pero presentan un umbral bajo a la producción de crisis convulsivas subsecuentes (Dube y cols., 2000).

Las CH prolongadas no se asocian a pérdida neuronal ni neurogénesis, pero se relacionan a un incremento de la conectividad del hipocampo inmaduro a largo plazo, como consecuencia del aumento de la rearborización de las fibras musgosas de las células granulares y de la capa molecular. Estos cambios se asocian a un incremento en la excitabilidad hipocampal (Bender y cols., 2003). Aunado a lo anterior, se muestra que las CH prolongadas producen una elevación de canales acoplados a nucleótidos cíclicos (HCN, por sus siglas en inglés), los cuales son activados por hiperpolarización. El incremento de estos canales, los cuales contribuyen a mantener el potencial de membrana en reposo en el hipocampo y son modulados mediante AMPc, puede ocasionar una elevada susceptibilidad a las crisis (Brewster y cols., 2002, 2005; Lupica y cols., 2001).

Evidencias experimentales indican que las CH pueden inducir un efecto pro- y anticonvulsivante. Se describe que la producción de CH aumenta el umbral a la producción de CH subsecuentes, un efecto que al parecer está mediado por el

neuropéptido Y (Dube y cols., 2005). El incremento de la excitabilidad neuronal y desarrollo de epileptogénesis subsecuentes a CH depende de la activación de procesos inflamatorios y de la recurrencia de las crisis, más que a su duración (Auvin y cols., 2005; Dube y cols., 2005). Los datos antes mencionados con este modelo (Baram y cols., 1997, Toth y cols., 1998; Chen y cols., 1999; Dube y cols., 2000, 2005; Brunson y cols., 2001; Bender y cols., 2003; Brewster y cols., 2002) indican que las CH prolongadas pueden tener consecuencias a largo plazo. Específicamente causa daño hipocampal agudo (Bender y cols., 2003; Toth y cols., 1998; Chen y cols., 1999) e incrementa la susceptibilidad para futuras crisis límbicas (Dube y cols., 2000).

## **2. Planteamiento del problema**

El mecanismo que causa y mantiene la excitabilidad inducida por las crisis hipertérmicas, aún no se ha elucidado, y no se conoce si las crisis “*per se*” o la hipertermia sola producen efectos a largo plazo y si éstas crisis en el desarrollo temprano están involucradas en el desarrollo de la ELT. El presente trabajo pretende conocer las modificaciones a corto y largo plazo de la susceptibilidad a crisis subsecuentes inducidas con PTZ, así como de los sitios de unión a GABA y BDZ del receptor GABA<sub>A</sub> y de la concentración tisular de aminoácidos excitatorios e inhibitorios en animales con crisis hipertérmicas, así como en animales con hipertermia y sin crisis.

## **3. Justificación**

Existe controversia acerca de que si las crisis febriles son la causa de la ELT. El presente estudio se diseñó con el propósito de investigar si las CH generadas por única vez en un periodo corto (20 min) en ratas inmaduras ocasionan cambios semejantes a los producidos por la ELT que se observan en animales adultos, inducidos por “*kindling*” eléctrico y AK. Se evaluó la unión de GABA y BDZ al receptor GABA<sub>A</sub>, el contenido tisular de aminoácidos y de la susceptibilidad a las crisis convulsivas inducidas por PTZ a diferentes tiempos en animales que previamente sufrieron CH en la etapa neonatal. Así mismo, los

resultados obtenidos con animales que sufrieron CH se compararon con los de animales que únicamente sufrieron hipertermia.

#### **4. Hipótesis**

Animales en desarrollo que presenten crisis hipertérmicas presentarán cambios en su susceptibilidad a crisis subsecuentes, así como en los niveles tisulares de aminoácidos inhibitorios y excitatorios, y en la unión de los receptores a GABA y BDZ en áreas cerebrales. Dichos cambios serán observados a corto plazo y serán semejantes a los cambios detectados en los modelos de ELT, tales como el "kindling" y el AK.

#### **5. Objetivos**

##### **5.1 Objetivo general**

Determinar a diferentes tiempos, la susceptibilidad a crisis subsecuentes, la concentración tisular de GABA, glicina, taurina, alanina, glutamina, aspartato y glutamato, así como la unión de receptores GABA<sub>A</sub> y BDZ en áreas cerebrales de ratas inmaduras que presentaron crisis inducidas por hipertermia.

##### **5.2 Objetivos específicos**

**5.2.1** Determinar a los 30 min, 24 h y 20 días después de inducir crisis convulsivas con hipertermia en ratas de 10 días de edad, la

latencia y la incidencia a presentar las siguientes conductas producidas por la administración de PTZ: crisis mioclónicas, crisis clónicas, crisis tónica o bien la muerte. Comparar dichos cambios con los producidos por la exposición a hipertermia sola.

**5.2.2** Evaluar a los 30 min, 24 h y 20 días después de inducir crisis convulsivas con hipertermia en ratas de 10 días de edad, los niveles de receptores a GABA<sub>A</sub> y benzodiazepinas en áreas cerebrales específicas, mediante la técnica autorradiográfica. Comparar dichos cambios con los producidos por la exposición a hipertermia sola.

**5.2.3** Cuantificar a los 30 min, 24 h y 20 días después de inducir crisis convulsivas con hipertermia en ratas de 10 días de edad, la concentración de aminoácidos inhibitorios y excitatorios en áreas cerebrales específicas, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

## **6. Materiales y métodos**

### **6.1 Animales**

Se utilizaron 22 ratas hembras de la cepa Sprague Dawley gestantes, las que se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio con temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , con períodos de luz-oscuridad de 12 h y con acceso libre al agua y al alimento. El día del nacimiento fue considerado el día 0. Las crías se mezclaron en el momento del nacimiento, se repartieron 10 animales por madre; 5 machos y 5 hembras. En el presente estudio se utilizaron tanto machos y hembras de 10 días de edad, debido a que no se observaron diferencias en los efectos inducidos por la hipertermia entre ambos géneros.

### **6.2 Modelo de crisis inducidas por hipertermia (CH)**

Dos crías de 10 días de edad, se colocaron en un recipiente de vidrio de 3 l de capacidad. Posteriormente se aplicó una corriente moderada de aire caliente, aproximadamente a 50 cm de los animales. La temperatura del recipiente se monitoreó con un termómetro digital para que no excediera los  $55^{\circ}\text{C}$ . A los animales se les registró la temperatura rectal cada 2 minutos y la hipertermia ( $40 - 41^{\circ}\text{C}$ ) se mantuvo durante 30 min. Las ratas se colocaron nuevamente con sus madres para que fueran rehidratadas.

### **6.3 Inducción de hipertermia sin crisis (HIP)**

Las crías de 10 días de edad, se anestesiaron con pentobarbital (PTB), (30mg/kg de peso), posteriormente, los animales se sometieron al procedimiento 6.2.

## **6.4 Grupos experimentales**

Después de su manipulación, los animales se utilizaron para los siguientes experimentos:

### **6.4.1 Experimentos para evaluar los efectos de las CH**

**6.4.1.1** A los 30 min después de presentar crisis hipertérmicas (grupo CH30min), los animales se utilizaron para evaluar el efecto del PTZ (n=10), determinar la unión de receptores a GABA y BDZ (n=7), o analizar el contenido tisular de aminoácidos excitatorios e inhibitorios (n=7).

**6.4.1.2** Las ratas se usaron para los procedimientos descritos en el punto 6.4.1.1, excepto que los animales se utilizaron a las 24 h después de presentar crisis hipertérmicas (grupo CH24h, n=7 para PTZ, n=10 para receptores; n=7 para contenido tisular).

**6.4.1.3** Las ratas se usaron para los procedimientos descritos en el punto 6.4.1.1, excepto que los animales se utilizaron a los 20 días después de presentar crisis hipertérmicas (grupo CH24h, n=10 para PTZ, n=7 para receptores; n=7 para contenido tisular).

Para cada grupo experimental se llevó en paralelo un grupo de crías control (CC), el cual se manipuló de acuerdo a lo descrito anteriormente, excepto que no se les indujeron CH. Se utilizó el mismo número de animales controles que los experimentales.

### **6.4.2 Experimentos para evaluar los efectos de la Hipertermia sin crisis**

**6.4.2.1** A los 30 min después de haber sido sometidos a hipertermia sin crisis, 7 animales se utilizan para determinar la unión a receptores a GABA y BDZ. El

efecto del PTZ, 30 min después de la hipertermia, debido a que a este tiempo aún se observan los efectos del pentobarbital.

**6.4.2.2** A las 24 h después de haber sido sometidos a hipertermia (H24h) sin crisis, los animales se utilizan para evaluar el efecto del PTZ (n=10) y determinar la unión del receptor a GABA<sub>A</sub> y BDZ (n=7)

**6.4.2.3** Las ratas con hipertermia sin crisis se usaron para los procedimientos descritos en el punto 6.4.1.1, excepto que se sacrifican 20 días después de la producción de hipertermia sin crisis (grupo H20d); n=10 para PTZ, n=7 para receptores).

Para cada grupo experimental se llevó en paralelo un grupo control (C=7 a 10), el cual se manipuló de acuerdo a lo descrito anteriormente, excepto que no se les aplicó ni HIP ni pentobarbital.

## **6.5 Evaluación del efecto del Pentilenetetrazol (PTZ)**

El pentilenetetrazol (PTZ), un antagonista del receptor GABA<sub>A</sub>, es uno de los agentes farmacológicos más utilizados para inducir crisis (Huang y cols., 2002; Pineau y cols., 1999). Este fármaco se utilizó para determinar el grado de susceptibilidad a crisis después de haber experimentado CH o HIP, de la misma manera se le aplicó al grupo control. Todos los animales recibieron una inyección de PTZ (80 mg/kg, i.p.) en

solución salina, en un volumen de 0.1 ml/10 g de peso. Posteriormente se evaluó durante 1 h la latencia así como el número de eventos y porcentaje de animales que presentaron las siguientes conductas: crisis mioclónicas (movimientos anormales sin pérdida de la postura), crisis clónicas (movimientos anormales con pérdida de la postura), crisis tónica (contracción y flexión de las extremidades anteriores y posteriores) y muerte de acuerdo a lo descrito por Yonekawa y cols., (1980). En paralelo se observó a un grupo de animales a los que únicamente se les administró PTZ a la misma concentración. Posteriormente los animales que sobrevivieron a este procedimiento se sacrificaron con una sobredosis de PTB.

#### **6.6 Autorradiografía para receptores a GABA<sub>A</sub> y a BDZ**

Los animales que se expusieron a CH e HIP, se utilizaron para determinar la unión del GABA y de las BDZ, se sacrificaron por decapitación, se disecó el cerebro y se congeló de inmediato en hielo seco, se obtuvieron cortes coronales de 20 µm a lo largo del cerebro, se colocaron en portaobjetos previamente gelatinizados y se almacenaron a -70°C, hasta su subsecuente procesamiento. Los experimentos de autorradiografía se realizaron de acuerdo a lo descrito previamente (Olsen y col., 1990; Rocha y col., 1993). Las soluciones amortiguadoras que se utilizaron para marcar receptores GABA<sub>A</sub> y BDZ fueron Tris citrato de sodio (50 mM, pH 7.4) y Tris-HCl (170 mM, pH 7.4), respectivamente. Los cortes se prelavaron durante 30 min a temperatura

ambiente con la solución amortiguadora correspondiente. Posteriormente, las secciones cerebrales se incubaron durante 45 min con [<sup>3</sup>H]muscimol (5 nM, con una actividad específica de 5.70 Ci/mmol, a 4 °C) para receptores a GABA<sub>A</sub>, y con [<sup>3</sup>H]flunitracepam (2 nM, con una actividad específica de 88 Ci/mmol, a 4 °C) para receptores a BDZ. Posteriormente, las secciones cerebrales se lavaron 2 veces en solución amortiguadora durante un minuto cada vez, a 4 °C y finalmente en agua destilada durante 3 segundos. Los cortes fueron secados con una corriente suave de aire frío. Las laminillas se colocaron en magazines de plomo para autorradiografía, junto con estándares de tritio y expuestas a temperatura ambiente a una película sensible a tritio durante 3 semanas para receptores a BDZ y por 4 meses para receptores GABA<sub>A</sub>. Posteriormente, las películas se revelaron usando un revelador Kodak (D11) y fijador rápido.

Las densidades ópticas (D. O.) que aparecieron sobre el autorradiograma se determinaron utilizando un programa de análisis de imágenes (JAVA, Jandel Software de análisis de video). Los valores se expresaron en fmol/mg de proteína. Para evaluar la unión no específica se adicionó un exceso de ligando no marcado (GABA y clordiacepoxido 1µm) a la incubación y se realizó el mismo procedimiento.

## **6.7 Determinación de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y de proteínas**

Para la determinación del contenido tisular de aminoácidos los animales se sacrificaron por decapitación y se les disecó la corteza, la amígdala, el hipocampo, el estriado, el cerebelo y el tallo cerebral. Estas estructuras cerebrales se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C, hasta su análisis, esto con el fin de reducir efectos post mortem. Para su evaluación, las regiones cerebrales

se pesaron y se homogenizaron en ácido perclórico (0.01 M) con metabisulfito de sodio 4 mM, en una proporción de 30  $\mu$ l por cada 10 mg de tejido en un homogenizador Thomas de émbolo de teflón, a una velocidad de 1000 rpm, durante 60 segundos. Todos estos procedimientos se realizaron a 4°C y las muestras de tejido se protegieron de la luz. Las proteínas se precipitaron por centrifugación a 10,000 g durante 4 min y se cuantificaron por el método de Lowry (1951) (ver después). El sobrenadante se utilizó para la determinación del contenido tisular de aminoácidos.

El sistema cromatográfico consistió de un detector fluorométrico (modelo 474) con un programa computacional Millennium 2010, ambos de Waters. El análisis se realizó de acuerdo a lo descrito por (Kendrick y cols., 1988). La cromatografía utilizada fue de fase reversa en la cual la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar; la fase móvil consistió en una mezcla de solución A (acetato de sodio 39.74 mM/metanol 10%, pH 5.7) y solución B (solución A al 20%/metanol 80%, pH 6.7), mientras que la fase estacionaria consistió en sílica gel.

El proceso cromatográfico incluyó un programa de gradientes que permite la separación de diferentes aminoácidos presentes en la muestra (Tabla III). La columna cromatográfica de alta resolución (Waters Nova-Pack C<sub>18</sub>, 4 $\mu$ m, 3.9 x 150 mm) se mantuvo con un flujo de 1.0 ml/min a una temperatura de 37°C. El sistema de detección de los aminoácidos se

realizó mediante derivatización adicionando orto-ftaldehído (OPA). La reacción con cada aminoácido es la formación de un isoindol,

Tabla III. Gradiente utilizado para la elusión de los aminoácidos. El porcentaje de la solución A y de la solución B, es el volumen que toma el cromatografo durante los 12 min.

| <b>Tiempo (min)</b> | <b>Flujo (ml/min)</b> | <b>%A</b> | <b>%B</b> |
|---------------------|-----------------------|-----------|-----------|
| 0                   | 1.0                   | 77        | 23        |
| .5                  | 1.0                   | 77        | 23        |
| 1                   | 1.0                   | 55        | 45        |
| 2.5                 | 1.0                   | 55        | 45        |
| 7                   | 1.0                   | 30        | 70        |
| 9                   | 1.0                   | 30        | 70        |
| 11                  | 1.0                   | 3         | 97        |
| 12                  | 1.0                   | 3         | 97        |

como producto entre el OPA, 2- $\beta$ -mercaptoetanol y el grupo amino del aminoácido. El isoindol es detectado por fluorescencia (Fig. 2), con una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 450 nm. El tiempo de elusión fue de 12 min para cada muestra.

Para la evaluación de los niveles de aminoácidos, los filtrados obtenidos se diluyeron en una proporción 1:250 con HClO<sub>4</sub> (0.1M). Se

tomaron 20  $\mu\text{l}$  de esta dilución y se le adicionaron 6  $\mu\text{l}$  de una mezcla de: OPA (3mg), metanol (60  $\mu\text{l}$ ), tetraborato de potasio (0.4 M, 0.56 ml) y 2- $\beta$ -mercaptoetanol (0.116 M, 5  $\mu\text{l}$ ). Se dejó reaccionar por 2 min y en seguida se inyectó al cromatógrafo. Diariamente se realizó una curva estándar, que se obtuvo con el empleo de una mezcla de cada uno de los aminoácidos analizados (Asp, Glu, Gln, Gly, Tau, Ala y GABA), a una concentración de 10 ng/ml. De esta se tomaron 10, 30 y 50  $\mu\text{l}$  y se aforaron a 1 ml con  $\text{HClO}_4$  (0.1 M). De cada dilución se tomaron 20  $\mu\text{l}$  que se mezclaron con 6  $\mu\text{l}$  de la mezcla de OPA.

Las proteínas se cuantificaron mediante el método espectrofotométrico descrito por Lowry y cols. (1951). El tejido cerebral se resuspendió con 250  $\mu\text{l}$   $\text{HClO}_4$ , posteriormente se diluyó 40 veces y de esta dilución se tomaron 100  $\mu\text{l}$ . La reacción se inició al agregar 500  $\mu\text{l}$  del reactivo A, el cual contenía 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{CuSO}_4$  al 1 % y 500  $\mu\text{l}$  de tartrato de sodio y potasio al 2% en 50 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 % diluido en  $\text{NaOH}$  (1N). La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó en reposo a temperatura ambiente. Después de 10 min se agregaron 500  $\mu\text{l}$  del reactivo B (reactivo de Folin diluido 1:2 con agua bidestilada). La muestra se agitó y a los 30 min, se midió la reacción colorimétrica en un espectrofotómetro Beckman UV/VIS a 700 nm. Este procedimiento asociado a los valores obtenidos de

la CLAR permite expresar las concentraciones de aminoácidos en ng/mg de proteína.

## 6.8 Análisis Estadístico

La latencia a los diferentes cambios conductuales producidos por el PTZ, así como la unión a receptores y la concentración tisular de aminoácidos, se analizaron con la prueba *t* de Student de dos colas, para promedios independientes. El porcentaje de animales que presentaron crisis mioclónicas, clónicas y tónica, además de la muerte producidas por el PTZ se analizaron con la prueba de  $X^2$ . El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa computacional SPSS 10.0. Aceptando en cada uno de los análisis un nivel de significancia de 0.05.

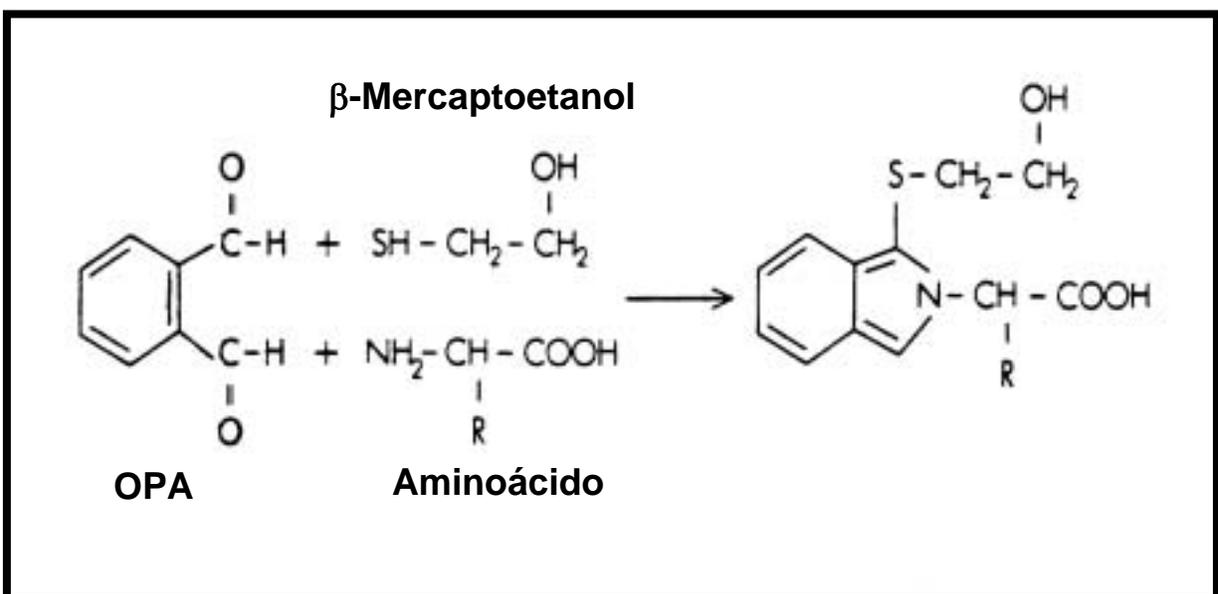


Figura 6. Reacción de derivatización. La OPA reacciona con el 2-β-mercaptoetanol y el grupo amino del aminoácido correspondiente formando un isoindol, producto que es detectado por fluorescencia.

## **7. Resultados**

### **7.1. Cambios conductuales durante la producción de Crisis Hipertérmicas (CH)**

Los cambios durante las CH consistieron en movimientos de succión, flexión unilateral del cuerpo y mordisqueo, seguido ocasionalmente de movimientos clónicos y de nado. Los animales del grupo CH30min presentaron  $14 \pm 2$  CH; el grupo CH24h presentó un total de  $16 \pm 2$  CH durante el procedimiento experimental mientras que el grupo CH20d experimentó  $16 \pm 3$  CH. Los animales expuestos a CH a la edad de 10 días, no mostraron cambios conductuales ni alteraciones en el peso en el momento del sacrificio 30 min, 24 h y 20 días después, al compararlos con sus controles.

### **7.2 Efecto de las crisis hipertérmicas en la susceptibilidad a crisis por PTZ**

Se analizó si los animales expuestos a CH presentan una mayor susceptibilidad al efecto proconvulsivante del PTZ. Para lo anterior, se determinaron a los 30 min, 24 h y 20 días después de inducir CH en ratas de 10 días de edad, la latencia y la incidencia a presentar las siguientes conductas producidas por la administración de PTZ: crisis mioclónicas, crisis clónicas, crisis tónica y muerte. Se compararon dichos cambios con los producidos por la exposición a hipertermia sola.

### **7.2.1 Efectos del PTZ a los 30 min después de las CH**

La administración de PTZ en animales del grupo control (CC30min), indujo que las crisis mioclónicas iniciaran a los  $0.86 \pm 0.20$  min, las crisis clónicas a los  $50.5 \pm 4.13$  min y la crisis tónica a los  $53.0 \pm 14.8$  min. El 100% de los animales presentaron mioclonus, crisis clónica y tónica, mientras que la muerte se produjo en el 80% a los  $60.2 \pm 0.10$  min (Figuras 7 y 8).

El grupo CH30min presentó una disminución significativa en la latencia a presentar la crisis clónica ( $2.39 \pm 0.52$  min, 95% y  $p < 0.01$ ) y tónica ( $25.0 \pm 9.72$  min, (47%) y  $p < 0.01$ ) y sin cambios en la latencia a las demás conductas evaluadas mioclónicas ( $0.82 \pm 0.49$  min), la muerte ( $50.7 \pm 9.38$  min). En este grupo hubo una reducción significativa en el porcentaje de animales que presentaron las siguientes conductas; crisis clónica (14%), crisis tónica (43%) y la mortalidad (37%) (Figura 7 y 8).

### **7.2.2 Efectos del PTZ a las 24 h después de las CH**

La administración de PTZ en los animales del grupo CC24h, provocó crisis mioclónicas a los  $0.76 \pm 0.12$  min, las crisis clónicas a los  $1.34 \pm 0.061$  min y la crisis tónica a los  $16.7 \pm$

3.0 min. El 100% de los animales presentaron crisis mioclónicas, clónica y crisis tónica y la muerte se produjo en el 80% de ellos, a los  $70.96 \pm 10.6$  min (Figuras 9 y 10).

El grupo CH24h mostró un aumento significativo en la latencia a presentar crisis mioclónicas ( $1.43 \pm 0.02$  min, (88%)  $p < 0.05$ ), crisis clónicas ( $2.15 \pm 0.38$  min, (60%,  $p < 0.05$ ), crisis tónica ( $55.70 \pm 2.15$  min, 233%,  $p < 0.01$ ) y sin cambio significativo en la latencia a la muerte ( $100.2 \pm 20.0$  min) por el PTZ. En este grupo el 100% de los animales presentaron crisis mioclónicas crisis clónicas, pero hubo una reducción en el porcentaje de animales que presentaron la crisis tónica (50%), así como en la mortalidad (67%) (Figuras 9 y 10).

### **7.2.3 Efectos del PTZ a los 20 días después de las CH**

Las crisis mioclónicas por el PTZ, en animales del grupo CC20d se presentaron a los  $1.07 \pm 0.03$  min, las crisis clónicas al  $1.18 \pm 0.04$  min y la crisis tónica a los  $16.0 \pm 1.5$  min. La muerte no se produjo en los animales de este grupo (Figura 11 y 12).

El grupo CH20d presentó una latencia a las crisis mioclónicas y a las crisis clónicas similar a la del grupo CC20d ( $1.11 \pm 0.03$  min y  $1.06 \pm 0.15$  min, respectivamente) y una disminución significativa en la latencia a la crisis

tónica (5.73 min; 64% y  $p < 0.05$ ). Se observó una reducción en el porcentaje de animales que presentaron crisis mioclónicas (29%), crisis clónica (29%) y crisis tónica (43%). La muerte no se produjo en los animales de este grupo. (Figura 11 y 12).

### **7.3 Efectos de la hipertermia en la susceptibilidad a crisis por PTZ**

#### **7.3.1 Efectos del PTZ a las 24 h después de la HIP**

La administración de PTZ en el grupo C24h indujeron en el 100% de los animales, crisis mioclónicas a los  $1.31 \pm 0.06$  min, las crisis clónicas a los  $18.52 \pm 0.85$  min y la crisis tónica a los  $37.1 \pm 1.83$  min. La muerte se produjo  $59.5 \pm 0.50$  min después del convulsivante, en el 25 % de las ratas (Figuras 13 y 14).

El grupo H24h presentó un aumento significativo en la latencia a presentar crisis mioclónicas ( $2.35 \pm 0.03$  min, 79% y  $p < 0.05$ ), así como una reducción en la latencia a presentar crisis clónicas ( $4.79 \pm 0.41$ , 75% y  $p < 0.05$ ) y crisis tónica ( $5.79 \pm 0.46$ , 84% y  $p < 0.01$ ). La muerte no se observó en este grupo experimental (Figura 13 y 14).

#### **7.3.2 Efectos del PTZ a los 20 días después de la HIP**

El grupo C20d presentó crisis mioclónicas a los  $1.02 \pm 0.10$  min, crisis clónicas a los  $10.08 \pm 0.74$  min y la crisis tónica a los  $17.31 \pm 0.53$  min. Ningún animal murió a consecuencia del PTZ (Figuras 15 y 16).

El grupo H20d presentó un incremento significativo en la latencia a presentar crisis mioclónicas ( $2.62 \pm 0.22$ , 156% y  $p < 0.01$ ) y crisis clónicas ( $16.35 \pm 0.53$ , 63% y  $p < 0.01$ ), pero no se presentaron cambios en la latencia a la crisis tónica ( $16.45 \pm 0.54$  min). La muerte no se produjo en este grupo (Figura 15 y 16).

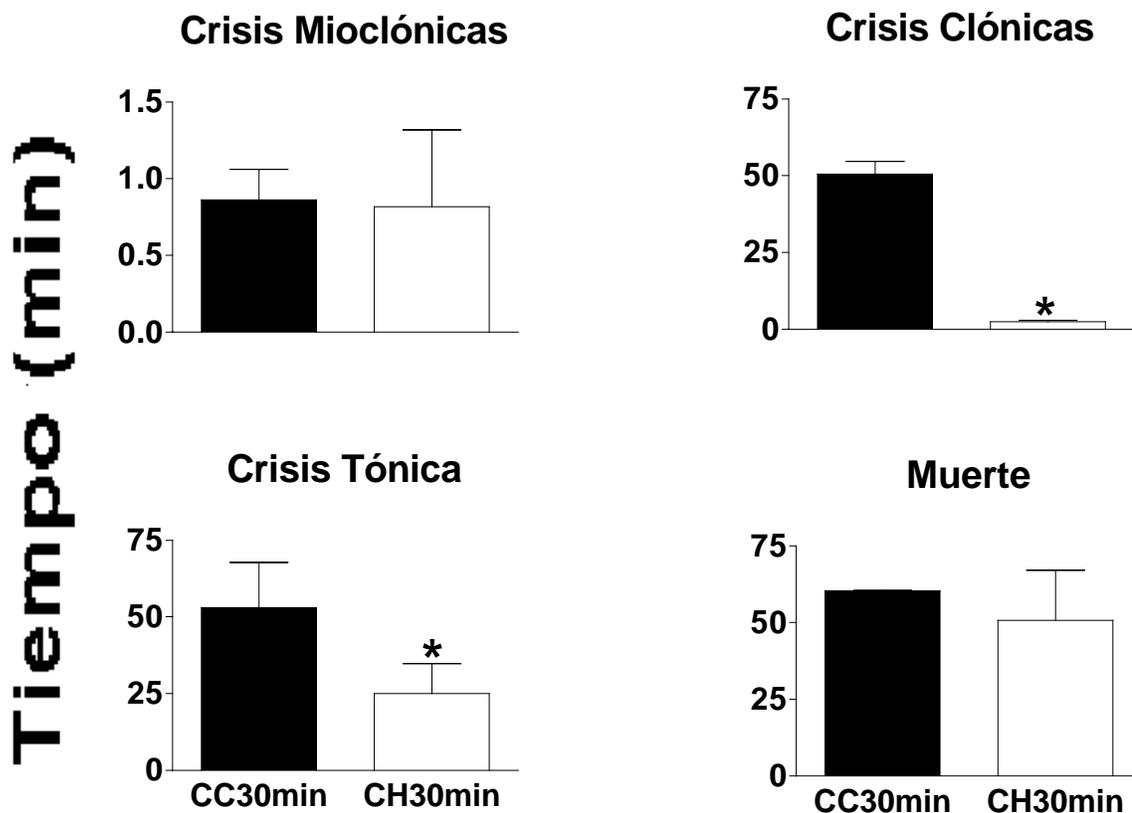


Figura 7. Latencia en minutos a las conductas inducidas por PTZ (80 mg/kg i.p.) en ratas inmaduras 30 min después de haber sido sometidas a CH (grupo CH30min), o su manipulación (grupo CC30min). Los valores representan la media  $\pm$  EE de 10 animales por grupo. *t* de Student, \* $p < 0.05$ .

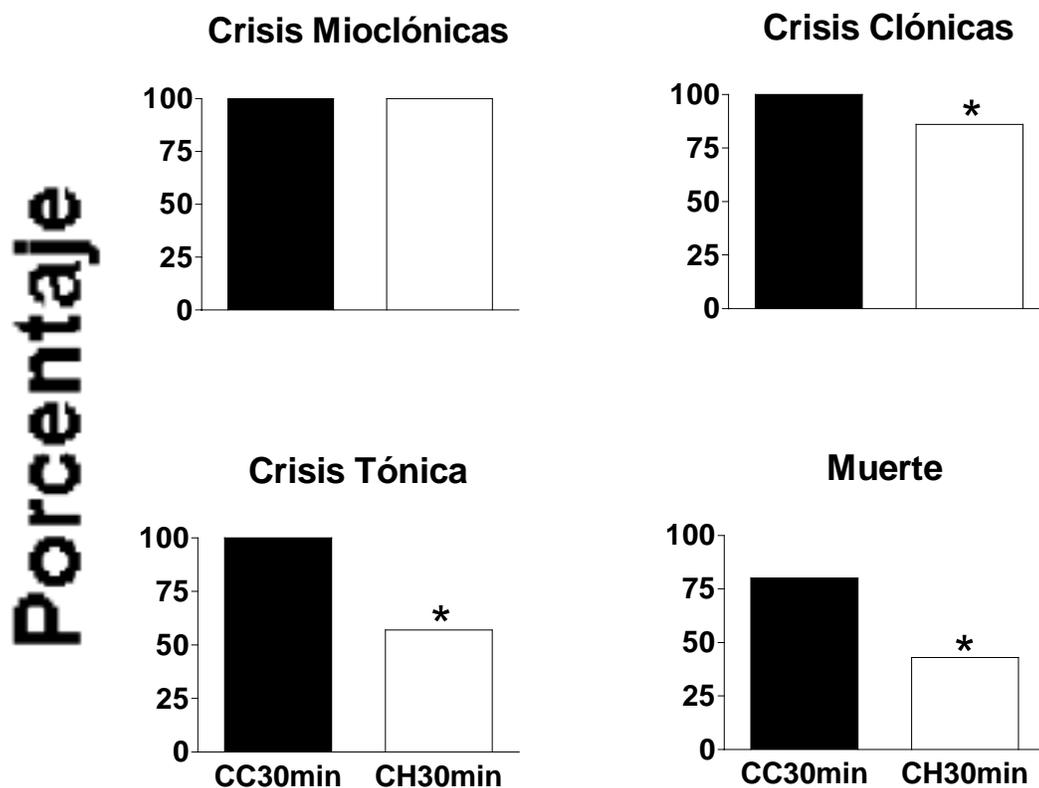


Figura 8. Porcentaje de animales que presentaron cambios conductuales inducidos por PTZ (80 mg/Kg i.p.), 30 min después de haber sido sometidos a CH (grupo CH30min), o de su manipulación (grupo CC30min).  $X^2$ , \* $p < 0.05$

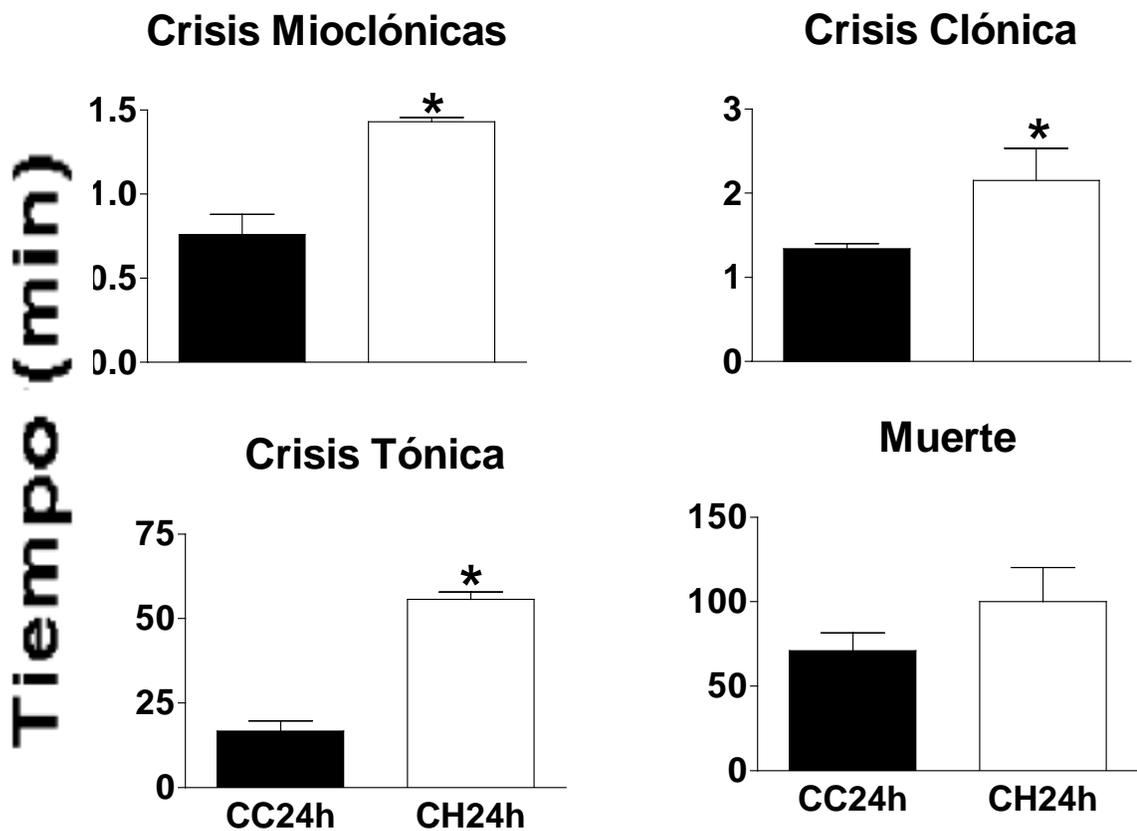


Figura 9. Latencia en min a las conductas inducidas por PTZ (80 mg/kg i.p.) en ratas inmaduras 24 h después de haber sido sometidas a CH (grupo CH24h) o de su manipulación (CC24h). Los valores representan la media  $\pm$  EE de 10 animales por grupo. *t* Student's, \* $p < 0.05$ .

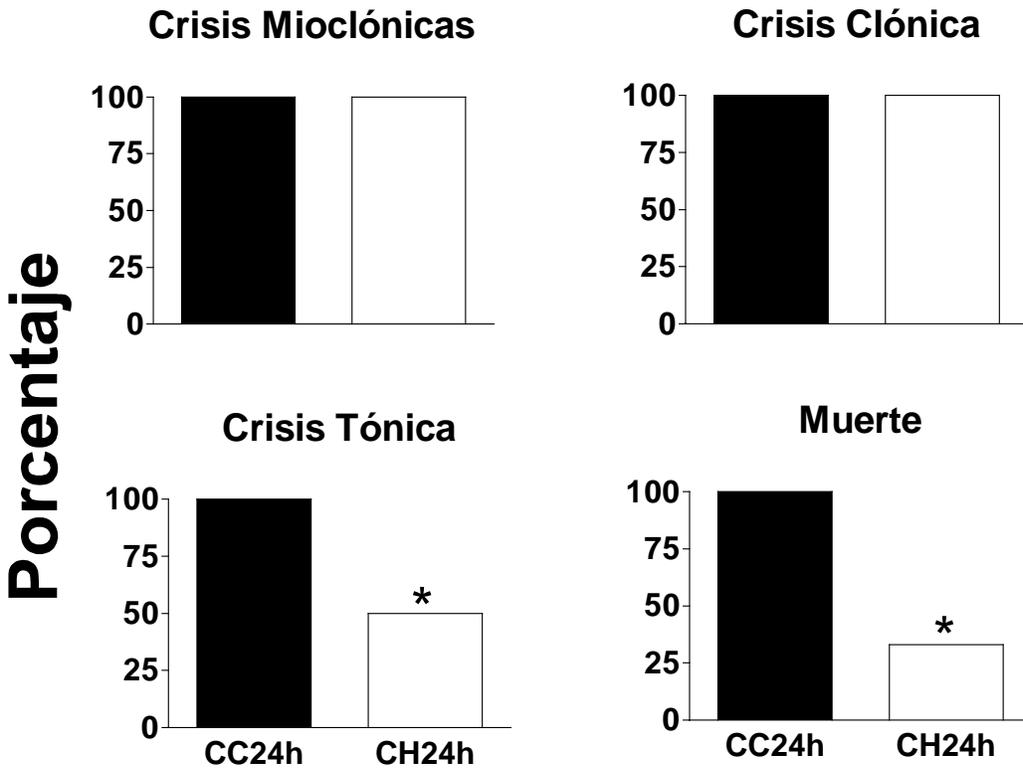
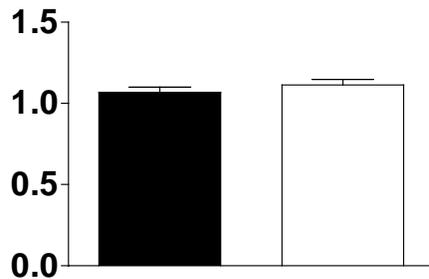


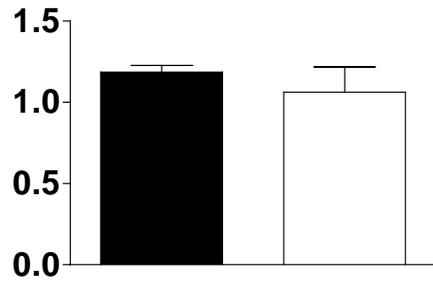
Figura 10. Porcentaje de animales que presentaron cambios conductuales inducidos por PTZ (80 mg/Kg i.p.), 24 h después de haber sido sometidos a CH (grupo CH24h), o de su manipulación (grupo CC24h).  $X^2$ , \* $p < 0.05$

Tiempo (min)

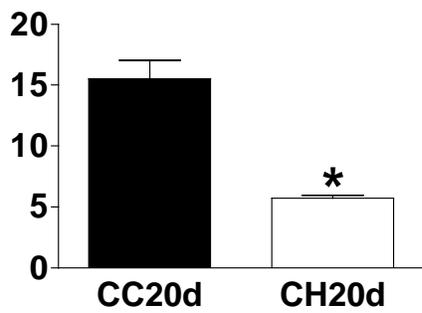
Crisis Mioclónicas



Crisis Clónica



Crisis Tónica



Muerte

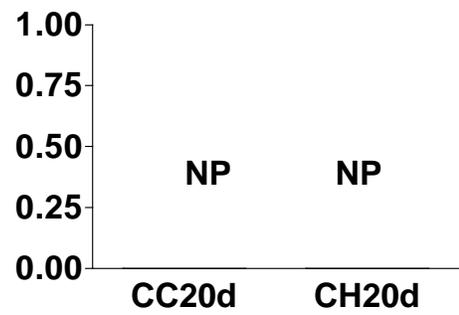


Figura 11. Latencia en min a las conductas inducidas por PTZ (80 mg/kg i.p.) en ratas inmaduras 20 días después de haber sido sometidas a CH (grupo CH20d), o de su manipulación (grupo CC20d). Los valores, representan la media  $\pm$  EE de 10 animales por grupo. *t* Student's, \**p* < 0.05. NP no presentó.

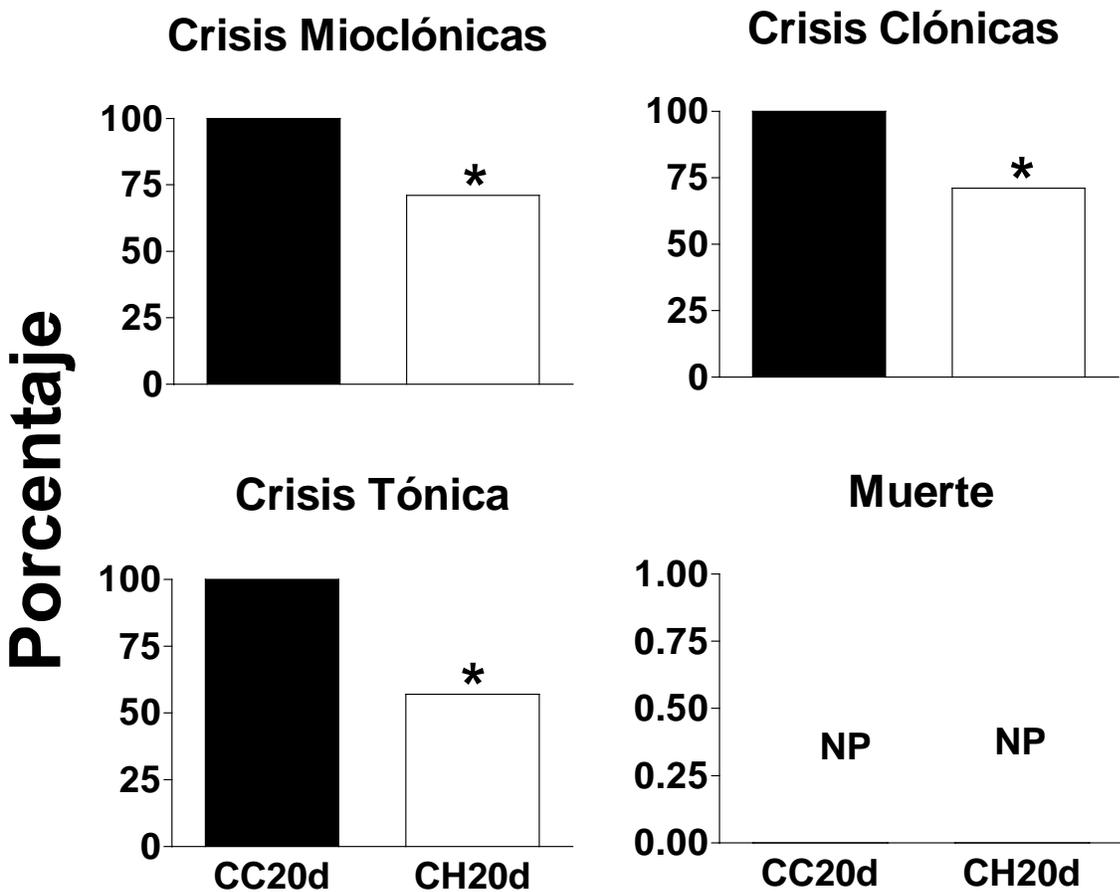


Figura 12. Porcentaje de animales que presentaron cambios conductuales inducidos por PTZ (80 mg/kg i.p.), 20 días después de haber sido sometidos a CH (grupo CH20d), o de su manipulación (grupo CC20d).  $X^2$ , \* $p < 0.05$ . NP no presentó.

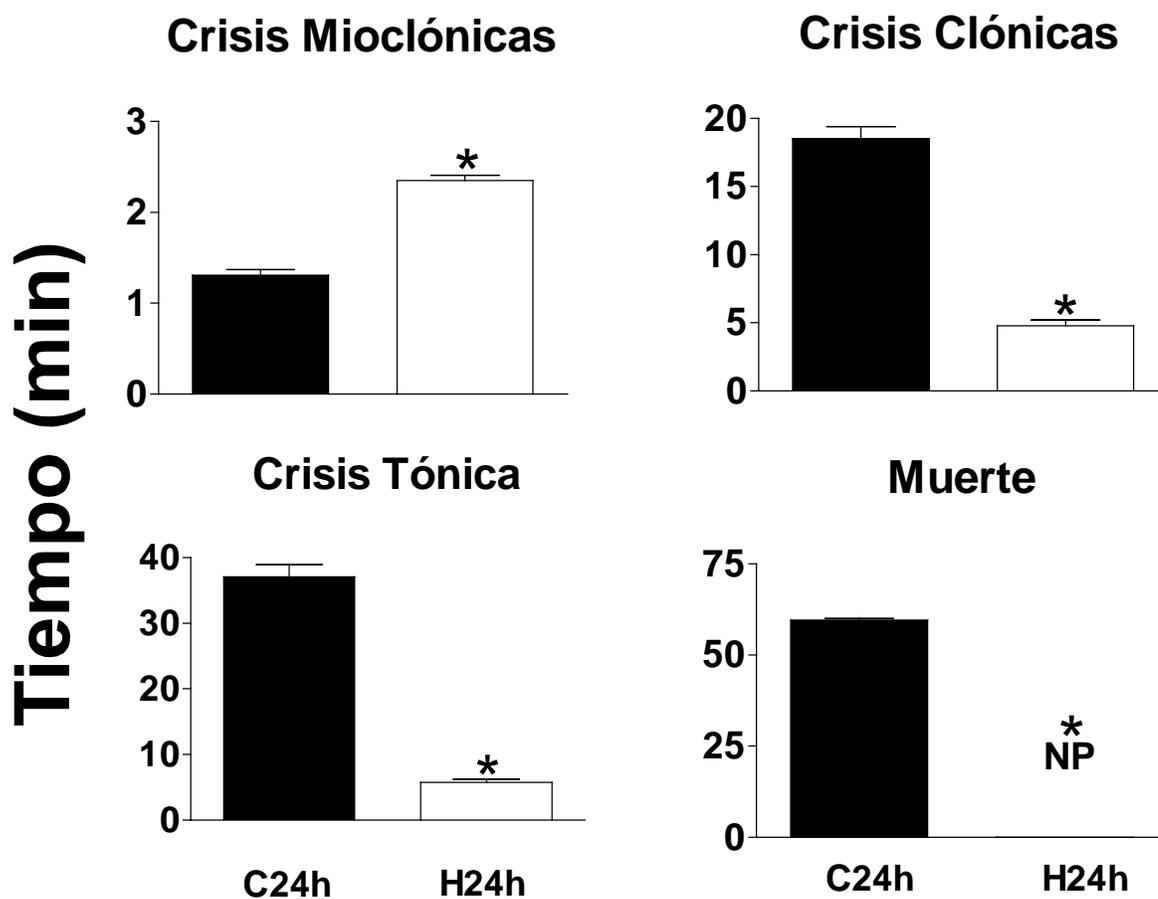


Figura 13. Latencia en min a las conductas inducidas por PTZ (80 mg/kg i.p.) en ratas inmaduras 24 h días después de haber sido sometidas a HIP (grupo H24h), o de su manipulación (grupo C24h). Los valores representan la media  $\pm$  EE de 10 animales por grupo. *t* Student's, \* $p < 0.05$ . NP no presentó.

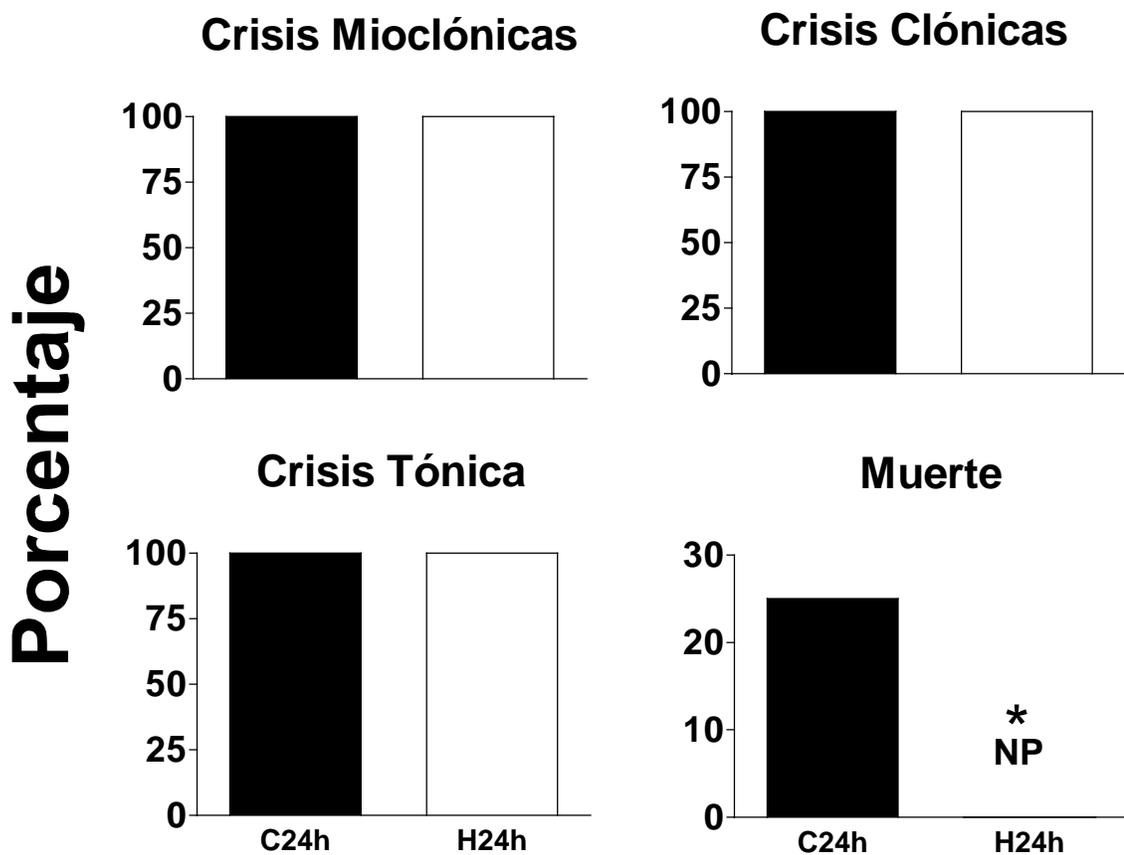


Figura 14. Porcentaje de animales que presentaron cambios conductuales inducidos por PTZ (80 mg/kg i.p.), 24 h después de haber sido sometidos a HIP (grupo H24h), o de su manipulación (grupo C24h).  $X^2$ , \* $p < 0.05$ . NP no presentó.

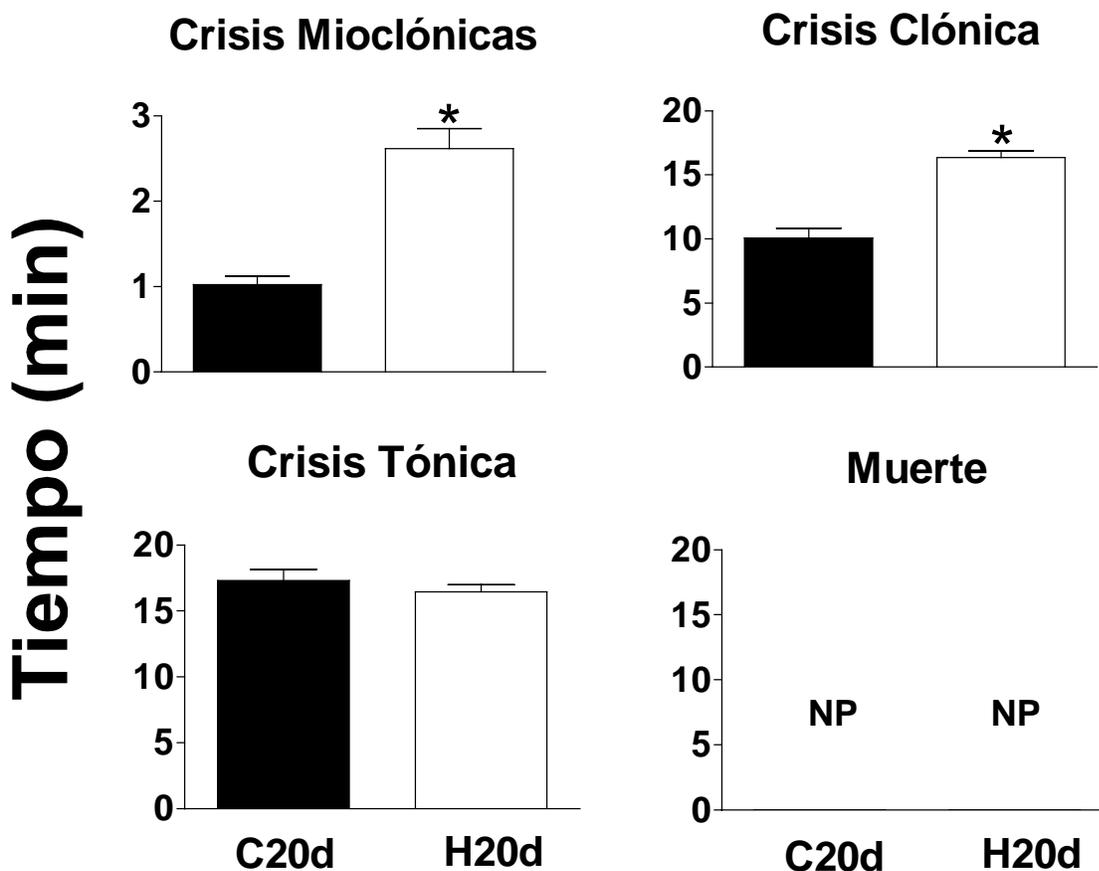


Figura 15. Latencia en min a las conductas inducidas por PTZ (80 mg/kg i.p.) en ratas inmaduras 20 días después de haber sido sometidas a HIP (grupo H20d), o de su manipulación (grupo C20d). Los valores representan la media  $\pm$  EE de 10 animales por grupo. *t* de Student, \* $p < 0.05$ . NP no presentó.

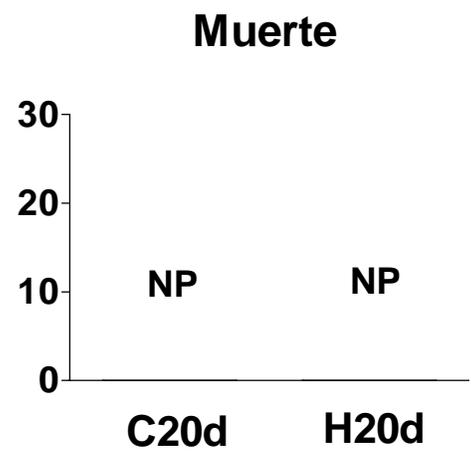
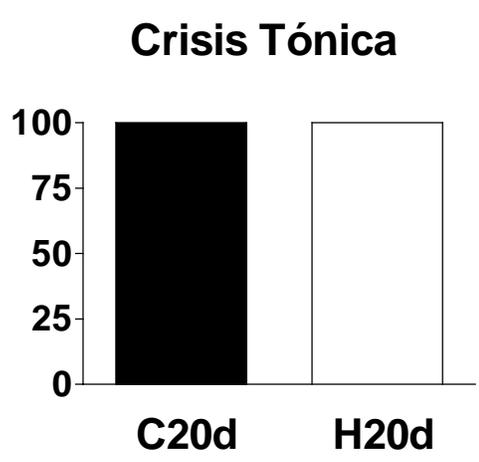
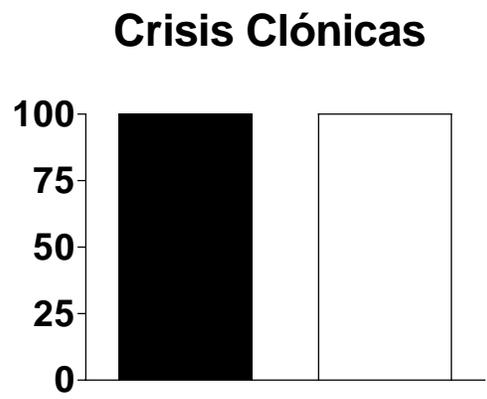
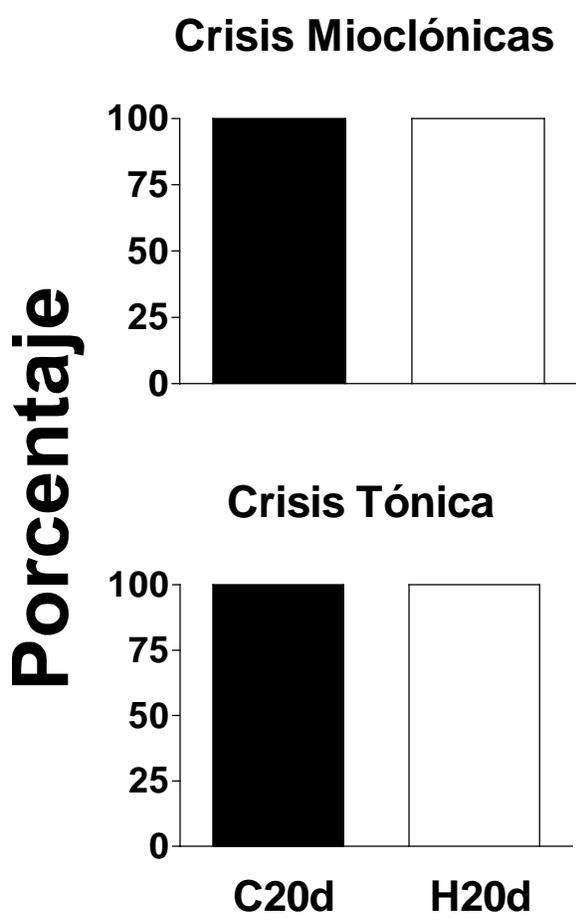


Figura 16. Porcentaje de animales que presentaron cambios conductuales inducidos por PTZ (80 mg/kg i.p.), 20 días después de haber sido sometidos a HIP (grupo H20d), o de su manipulación (grupo C20d).  $\chi^2$ , \* $p < 0.05$ .

#### **7.4 Efecto de las crisis hipertérmicas en la unión de receptores a GABA<sub>A</sub> y BDZ**

Se evaluó si animales expuestos a CH presentan un aumento en la unión a GABA<sub>A</sub> y BDZ, a corto y largo plazo, similar al encontrado en animales adultos con crisis epilépticas inducidas por el “kindling” y AK. Dichos cambios se investigaron a los 30 min, 24 h y 20 días después de inducir CH en ratas de 10 días de edad, en áreas cerebrales específicas, mediante la técnica de autorradiografía. Se compararon dichos cambios con los producidos por la exposición a hipertermia sola.

##### **7.4.1 Receptores GABA<sub>A</sub> y BDZ 30 min después de las CH**

Los resultados se expresan en el por ciento de aumento con respecto al control. La autorradiografía mostró que el grupo CH30min presentó un incremento significativo de la unión del [<sup>3</sup>H]muscimol en las cortezas del cíngulo (298%), frontal (360%), parietal anterior (288%), parietal posterior (319%), piriforme (347%), entorrinal (177%), perirrinal (243%) y temporal (133%); estriado (519%) y núcleo accumbens (606%); los núcleos amigdalinos, el basolateral (536%), central (253%) y medial (316%); el hipotálamo (351%) y el tálamo (414%); el giro dentado (476%), las áreas CA1 (168%), CA2 (611%)

y CA3 (384%) del hipocampo; la sustancia *nigra pars reticulata* (329%), la compacta (197%) y la sustancia gris periacueductal (371%), (Figuras 17, 19, 20, 21 y Tabla IV).

Respecto a la unión del [<sup>3</sup>H]flunitracepam, el grupo CH30min mostró un aumento significativo de los niveles de unión en las cortezas entorrinal (26%) y perirrinal (36%), así como una disminución en el núcleo basolateral de la amígdala (18%) (Figuras 18, 19, 20, 21 y Tabla V).

#### **7.4.2 Receptores GABA<sub>A</sub> y BDZ 24 h después de las CH**

El grupo CH24h mostró un aumento en la unión del [<sup>3</sup>H]muscimol en las cortezas del cíngulo (121%), frontal (114%), parietal anterior (67%), parietal posterior (105%), piriforme (71%), entorrinal (205%) perirrinal (67%) y la temporal (132%); estriado (39%), núcleo accumbens (42%); los núcleos de la amígdala el basolateral (88%), central (147%) y medial (70%); el tálamo (147%), giro dentado (59%), las áreas CA2 (94%) y CA3 (48%) del hipocampo; la *sustancia nigra pars reticulata* (434%), la compacta (68%) y la sustancia gris periacueductal (229%), (Figuras 17, 19, 20, 21 y Tabla VI).

El grupo CH24h demostró un aumento significativo en la unión del [<sup>3</sup>H]flunitracepam en las cortezas del cíngulo (240%), frontal (67%), parietal posterior (79%), entorrinal (35%), perirrinal (25%) y temporal (42%); en el estriado (24%), núcleo accumbens (20%); la amígdala basolateral (51%), central (32%) y medial (49%), y la sustancia *nigra pars compacta* (33%) (Figuras 18, 19, 20, 21 y Tabla VII).

#### **7.4.3 Receptores GABA<sub>A</sub> y BDZ 20 días después de las CH**

El grupo CH20d presentó un aumento significativo en la unión del [<sup>3</sup>H]muscimol en las cortezas del cíngulo (224%), frontal (295%), parietal anterior (113%), parietal posterior (324%), piriforme (111%), entorrinal (109%), perirrinal (94%) y la temporal (164%); el núcleo accumbens (115%); los núcleos de la amígdala basolateral (124%), central (196%) y medial (168%); el hipotálamo (178%) y el tálamo (218%); el giro dentado (139%), las áreas CA1 (164%), CA2 (118%) y CA3 (96%) del hipocampo; la sustancia *nigra pars reticulata* (110%) y la compacta (106%) y la sustancia gris periacueductal (98%), (Figuras 17, 19, 20, 21 y Tabla VIII).

Los animales del grupo CH20d presentaron un aumento significativo en la unión del [<sup>3</sup>H]flunitracepam en las cortezas del cíngulo (90%), frontal (71%), parietal anterior (36%) y parietal posterior (69%), así como en la sustancia *nigra pars reticulata* (28%). Este grupo experimental también mostró una disminución significativa en el accumbens (25%) y en la sustancia *nigra pars compacta* (38%) (Figuras 18, 19, 20, 21 y Tabla IX).

## **7.5 Efecto de la Hipertermia en la unión de receptores a GABA<sub>A</sub> y BDZ**

### **7.5.1 Receptores GABA<sub>A</sub> y BDZ 30 min después de la Hipertermia**

Los resultados de la autorradiografía mostraron que el grupo H30min presentó un aumento significativo de la unión del [<sup>3</sup>H]muscimol en las cortezas del cíngulo (608%), frontal (595%), parietal anterior (579%), parietal posterior (656%), piriforme (633%), entorrinal (592%), perirrinal (612%) y temporal (434%); estriado (573%) y núcleo accumbens (549%); los núcleos de la amígdala, el basolateral (643%), central (599%) y medial (580%); el hipotálamo (434%) y el tálamo (547%); el giro dentado (576%), las áreas CA1 (552%), CA2 (559%) y CA3 (526%) del hipocampo; la sustancia *nigra pars*

*reticulata* (577%), la compacta (498%) y la sustancia gris periacueductal (518%) (Tabla X).

Concerniente a la unión del [<sup>3</sup>H]flunitracepam, el grupo H30min mostró un aumento significativo de los niveles de unión en las cortezas del cíngulo (45%), frontal (28%), parietal anterior (36%), parietal posterior (74%), piriforme (87%), entorrinal (192%), perirrinal (119%) y temporal (280%); estriado (74%) y núcleo accumbens (145%); los núcleos de la amígdala, el basolateral (66%), central (75%) y medial (125%); el hipotálamo (128%) y el tálamo (178%); el giro dentado (252%), las áreas CA1 (252%), CA2 (37%) y CA3 (162%) del hipocampo; la sustancia *nigra pars reticulata* (143%), *pars compacta* (102%) y la gris periaqueductal (154%) (Tabla XI).

### **7.5 2 Receptores GABA<sub>A</sub> y BDZ 24 h después de la hipertermia**

El grupo H24h mostró un aumento en la unión del [<sup>3</sup>H]muscimol en las cortezas del cíngulo (257%), frontal (234%), parietal anterior (297%), parietal posterior (319%), piriforme (291%), entorrinal (271%), perirrinal (233%) y temporal (270%); estriado (141%) y núcleo accumbens (275%); los núcleos de la amígdala, el basolateral (222%), central (266%) y medial (207%); el hipotálamo (244%) y el tálamo (251%); el giro dentado (176%), las áreas CA1 (251%), CA2 (318%) y CA3 (184%) del hipocampo; la sustancia *nigra pars reticulata* (278%), la compacta (235%) y la sustancia gris periacueductal (279%), (Tabla XII).

Con respecto a los receptores BDZ el grupo H24h mostró un aumento significativo en la unión del [<sup>3</sup>H]flunitracepam en las cortezas del cíngulo (48%), frontal (166%), piriforme (48%), perirrinal (62%); el núcleo accumbens (57%); núcleo de la

amígdala central (44%); el hipotálamo (59%); el giro dentado (59%), las áreas CA1 (39%), CA2 (83%) y CA3 (69%) del hipocampo; la sustancia *nigra pars reticulata* (49%) y la sustancia gris periacueductal (66%), así como una reducción significativa en la corteza parietal anterior (28%) y posterior (20%) (Tabla XIII).

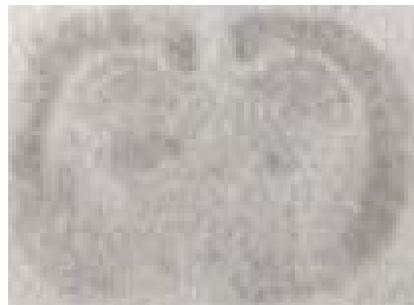
### 7.5.3 Receptores GABA<sub>A</sub> y BDZ 20 días después de la hipertermia

El grupo H20d presentó un aumento significativo en la unión del [<sup>3</sup>H]muscimol en las cortezas del cíngulo (131%), frontal (164%), parietal anterior (123%), parietal posterior (137%), piriforme (64%), entorrinal (105%), perirrinal (86%) y la temporal (132%); estriado (107%) y el núcleo accumbens (113%); los núcleos de la amígdala basolateral (54%), central (70%) y medial (60%); el hipotálamo (64%) y el tálamo (125%); el giro dentado (108%), las áreas CA1 (82%), CA2 (99%) y CA3 (91%) del hipocampo; la sustancia *nigra pars reticulata* (121%) y la compacta (106%) y la sustancia gris periacueductal (105%) (Tabla XIV).

Los animales del grupo H20d presentaron un aumento significativo en la unión del [<sup>3</sup>H]flunitracepam en las cortezas del cíngulo (51%), piriforme (92%), entorrinal (62%), perirrinal (93%) y temporal (98%); estriado (135%) y el núcleo accumbens (61%); los núcleos de la amígdala basolateral (127%), central (114%) y medial (74%); el giro dentado (43%), las áreas CA1 (81%), CA2 (80%) y CA3 (60%) del hipocampo; sustancia *nigra pars reticulata* (134%), *compacta* (146%) y la gris periacueductal (110%) (Tabla XV).

**Control**

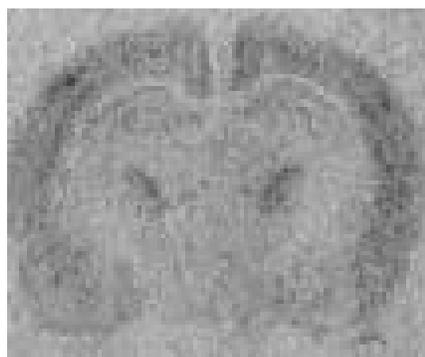
**Hipertérmico**



**30 min**



**24 h**



**20 días**

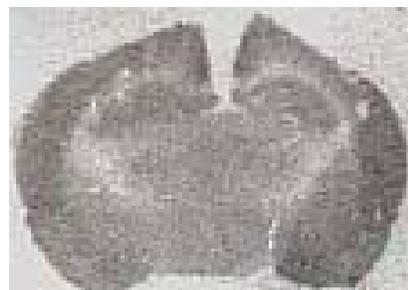
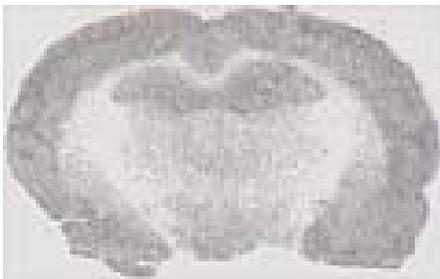
Figura 17. Distribución de la unión del [<sup>3</sup>H]muscimol al receptor GABA<sub>A</sub> en cortes coronales a nivel de la amígdala e hipocampo dorsal de animales control (izquierda) y de animales con CH (derecha), sacrificados a los 30 min, 24 h y 20 días después de las CH o su manipulación. Las estructuras con mayor unión al receptor aparecen como áreas oscuras y grises, mientras que las estructuras claras indican una unión baja al receptor. Los cortes del grupo CH mostraron un aumento en la unión del [<sup>3</sup>H]muscimol en la corteza, hipocampo y amígdala a los 30 min, 24 h y 20 días después de las CH, al compararlo con cortes de los grupos control.

**Control**

**Hipertérmico**



**30 min**



**24 h**



## 20 días

Figura 18. Distribución de la unión del [ $^3\text{H}$ ]flunitracepam al receptor BDZ en cortes coronales a nivel de la amígdala e hipocampo dorsal de animales control (izquierda) y de animales con CH (derecha), sacrificados a los 30 min, 24 h y 20 días después de las CH o su manipulación. Las estructuras con mayor unión al receptor aparecen como áreas oscuras y grises, mientras que las estructuras claras indican una unión baja al receptor. Los cortes del grupo CH mostraron un aumento en la unión del [ $^3\text{H}$ ]flunitracepam en la corteza y amígdala 24 h después de las CH, al compararlo con cortes de los grupos control.

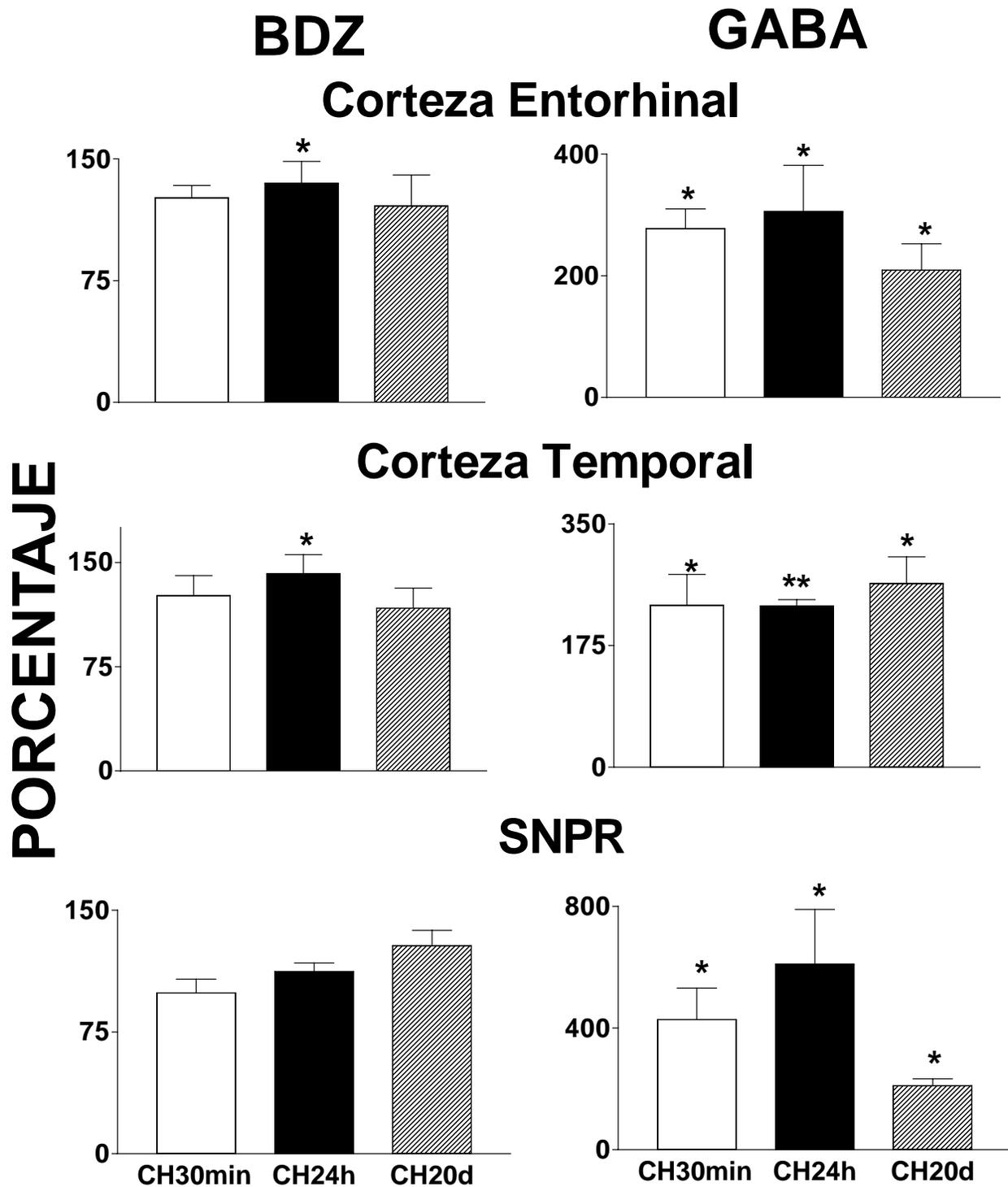


Figura 19. Porcentaje de cambio con respecto a su grupo control en la unión del  $[^3\text{H}]$ flunitrazepam y del  $[^3\text{H}]$ muscimol al receptor BDZ y  $\text{GABA}_A$  respectivamente, en las cortezas entorhinal, temporal y en la sustancia *nigra pars reticulata* (SNPR) de ratas inmaduras sacrificadas a los 30 min (CH30min), 24 h (CH24h) y a los 20 días (CH20d) después de ser

sometidas a CH. Los valores representan la media  $\pm$  EE de 10 animales. *t* Student's \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

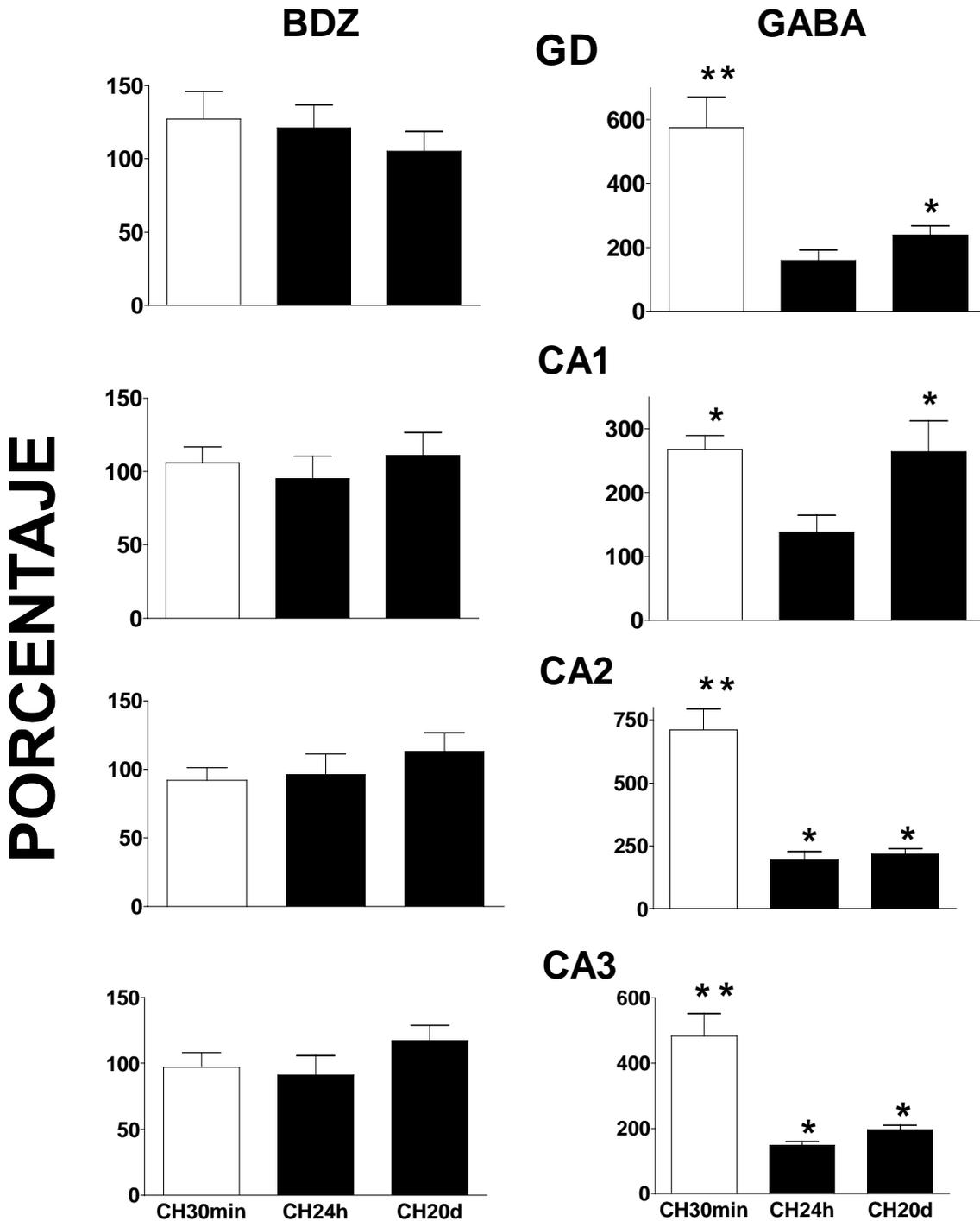


Figura 20. Porcentaje de cambio con respecto a su grupo control en la unión del  $[^3\text{H}]$ flunitrazepam y del  $[^3\text{H}]$ muscimol al receptor BDZ y  $\text{GABA}_A$  respectivamente, en el giro dentado (GD) y en las áreas CA1, CA2 y CA3

del hipocampo de ratas inmaduras sacrificadas a los 30 min (CH30min), 24 h (CH24h) y a los 20 días (CH20d) después de ser sometidas a CH. Los valores representan la media  $\pm$  EE de 10 animales. *t* Student's, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

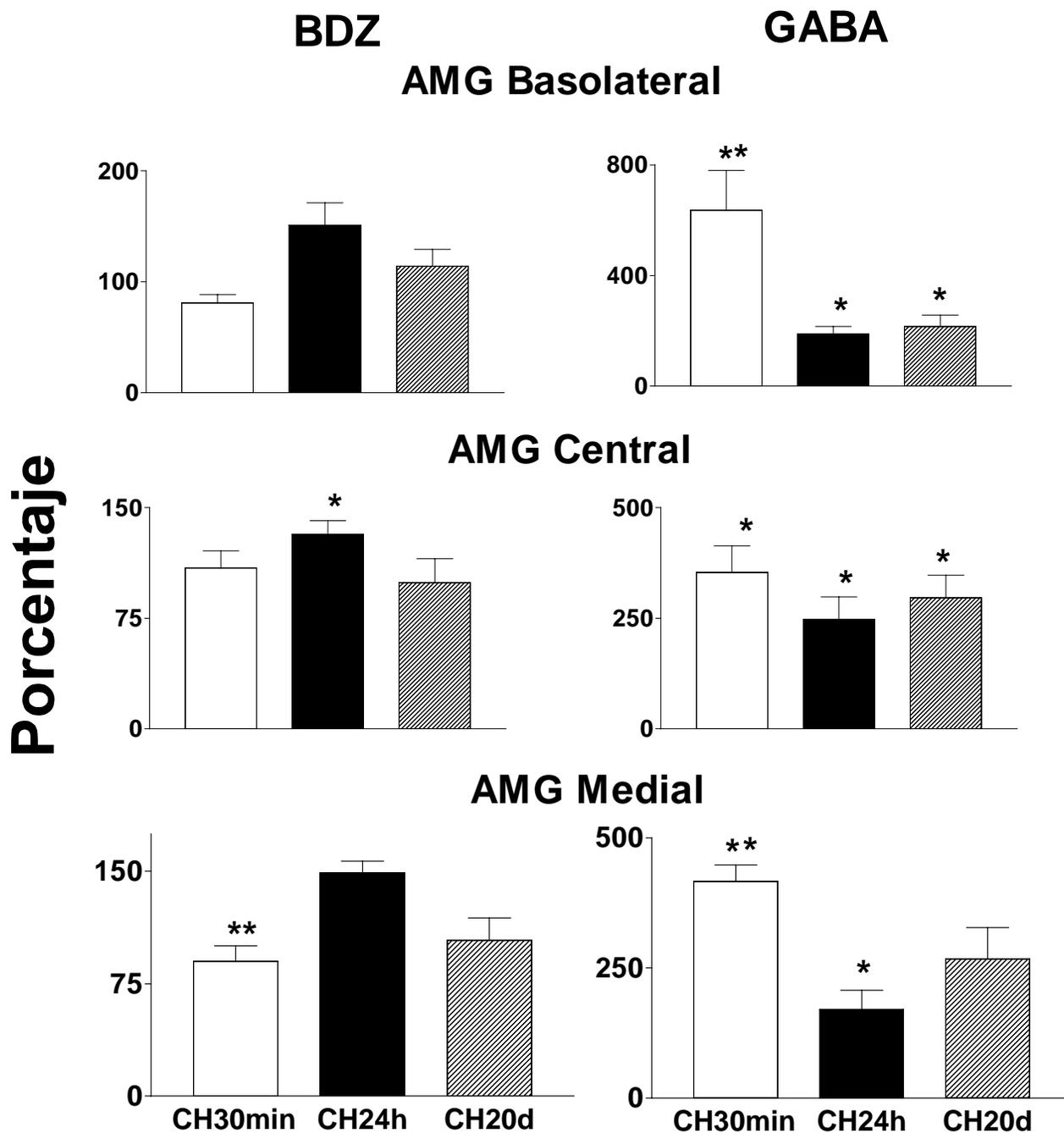


Figura 21. Porcentaje de cambio con respecto a su grupo control en la unión del  $[^3\text{H}]$ flunitrazepam y del  $[^3\text{H}]$ muscimol al receptor BDZ y  $\text{GABA}_A$  respectivamente, en la amígdala (AMG) basolateral, central y medial de

ratas inmaduras sacrificadas a los 30 min (CH30min), 24 h (CH24h) y a los 20 días (CH20d) después de ser sometidas a CH. Los valores representan la media  $\pm$  EE de 10 animales. *t* Student's \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01.

Tabla IV. Unión del [<sup>3</sup>H]muscimol expresada en fmol/mg proteína, en regiones específicas del cerebro de ratas inmaduras sacrificadas 30 min después de inducirles CH (grupo CH30min) o de su manipulación (grupo CC30min).

Los valores representan la media  $\pm$  EE de 10 animales. Cx, Corteza; AMG, Amígdala;

PR, *Pars Reticulata*; PC *pars compacta*; GP, Gris Periacueductal. *t* de Student, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01

Tabla V. Unión del [<sup>3</sup>H]flunitracepam expresada en fmol/mg proteína, en regiones específicas del cerebro de ratas inmaduras sacrificadas 30 min después de inducirles CH (grupo CH30min), o de su manipulación (grupo

| Grupos                    |                         |               |     |
|---------------------------|-------------------------|---------------|-----|
| Estructuras               | CC30min                 | CH30min       | %   |
| Cx del Cíngulo            | 98.7 ± 25               | 393.8 ± 56**  | 299 |
| Cx Frontal                | 89.3 ± 22               | 411.5 ± 53**  | 361 |
| Cx Parietal Anterior      | 159.1 ± 35              | 618.5 ± 97**  | 288 |
| Cx Parietal Posterior     | 111.4 ± 30              | 467.5 ± 62**  | 320 |
| Cx Piriforme              | 67.3 ± 14               | 301.0 ± 46*   | 347 |
| Cx Entorrinal             | 132.5 ± 43              | 368.2 ± 43*   | 177 |
| Cx Perirrinal             | 158.1 ± 28              | 543.4 ± 81**  | 244 |
| Cx Temporal               | 244.9 ± 91              | 572.3 ± 108*  | 133 |
| Estriado                  | 49.4 ± 6                | 306.2 ± 52**  | 519 |
| Núcleo Accumbens          | 45.9 ± 7                | 324.4 ± 50**  | 607 |
| AMG Basolateral           | 72.1 ± 11               | 459.5 ± 103** | 536 |
| AMG Central               | 79.3 ± 14               | 280.2 ± 48*   | 253 |
| AMG Medial                | 73.2 ± 11               | 304.6 ± 23**  | 316 |
| Hipotálamo                | 76.1 ± 16               | 343.6 ± 73**  | 351 |
| Tálamo                    | 92.6 ± 26               | 476.3 ± 82**  | 414 |
| Giro Dentado              | 79.2 ± 19               | 456.4 ± 76**  | 476 |
| CA 1                      | 149.7 ± 30              | 402.0 ± 32*   | 168 |
| CA 2                      | 55.8 ± 9                | 397.1 ± 46**  | 611 |
| CA 3                      | 95.4 ± 20               | 461.8 ± 65**  | 384 |
| Sustancia <i>nigra</i> PR | 105.9 ± 39              | 454.4 ± 110*  | 329 |
| Sustancia <i>nigra</i> PC | 114.6 ± 43              | 341.1 ± 57**  | 198 |
| Sustancia GP              | 79.2 ± 20 <sup>38</sup> | 373.8 ± 79*   | 372 |

CC30min).

Anotaciones como en la Tabla IV.

| <b>Estructura</b>         | <b>Grupos</b>  |                | <b>%</b> |
|---------------------------|----------------|----------------|----------|
|                           | <b>CC30min</b> | <b>CH30min</b> |          |
| Cx del Cíngulo            | 358.0 ± 21     | 347.2 ± 35     | -3       |
| Cx Frontal                | 396.1 ± 40     | 364.2 ± 41     | -8       |
| Cx Parietal Anterior      | 356.6 ± 33     | 333.5 ± 51     | -4       |
| Cx Parietal Posterior     | 319.7 ± 27     | 306.3 ± 32     | -7       |
| Cx Piriforme              | 273.4 ± 13     | 279.8 ± 22     | 2        |
| Cx Entorrinal             | 232.9 ± 19     | 293.6 ± 17*    | 26       |
| Cx Perirrinal             | 288.6 ± 17     | 393.3 ± 52*    | 36       |
| Cx Temporal               | 248.5 ± 29     | 313.6 ± 36     | 26       |
| Estriado                  | 223.2 ± 10     | 209.5 ± 27     | -7       |
| Núcleo Accumbens          | 186.6 ± 21     | 215.5 ± 26     | 15       |
| AMG Basolateral           | 305.5 ± 32     | 248.5 ± 23*    | -19      |
| AMG Central               | 234.4 ± 23     | 256.3 ± 27     | 9        |
| AMG Medial                | 288.7 ± 14     | 262.4 ± 27     | -9       |
| Hipotálamo                | 245.2 ± 18     | 202.4 ± 22     | -17      |
| Tálamo                    | 241.7 ± 13     | 248.2 ± 17     | 21       |
| Giro Dentado              | 265.2 ± 12     | 338.8 ± 50     | 28       |
| CA 1                      | 260.1 ± 15     | 278.1 ± 27     | 7        |
| CA 2                      | 255.7 ± 19     | 237.1 ± 23     | -7       |
| CA 3                      | 292.5 ± 12     | 284.0 ± 32     | -3       |
| Sustancia <i>nigra</i> PR | 226.5 ± 16     | 225.3 ± 19     | -0.5     |
| Sustancia <i>nigra</i> PC | 234.1 ± 15     | 225.3 ± 15     | -4       |
| Sustancia GP              | 192.0 ± 12     | 211.1 ± 19     | 10       |

Tabla VI. Unión del [<sup>3</sup>H]muscimol expresada en fmol/mg proteína, en regiones específicas del cerebro de ratas inmaduras sacrificadas 24 h después de inducirles CH (grupo CH24h), o de su manipulación (grupo CC24h).

Anotaciones como en la Tabla IV.

Tabla VII. Unión del [<sup>3</sup>H]flunitracepam expresada en fmol/mg proteína, en

| Grupos                    |                          |               |     |
|---------------------------|--------------------------|---------------|-----|
| Estructura                | CC24h                    | CH24h         | %   |
| Cx del Cíngulo            | 319.8 ± 34               | 707.3 ± 73**  | 121 |
| Cx Frontal                | 351.5 ± 39               | 755.5 ± 34**  | 115 |
| Cx Parietal Anterior      | 400.2 ± 53               | 670.6 ± 81**  | 106 |
| Cx Parietal Posterior     | 326.3 ± 27               | 671.1 ± 81* * | 68  |
| Cx Piriforme              | 236.4 ± 36               | 404.8 ± 93*   | 71  |
| Cx Entorrinal             | 187.1 ± 18               | 571.8 ± 147*  | 205 |
| Cx Perirrinal             | 351.3 ± 74               | 587.7 ± 87*   | 167 |
| Cx Temporal               | 322.0 ± 45               | 747.3 ± 28**  | 132 |
| Estriado                  | 175.1 ± 19               | 243.6 ± 14*   | 39  |
| Núcleo Accumbens          | 153.9 ± 16               | 219.2 ± 5**   | 43  |
| AMG Basolateral           | 256.9 ± 43               | 483.1 ± 70*   | 88  |
| AMG Central               | 156.7 ± 17               | 387.5 ± 80*   | 147 |
| AMG Medial                | 226.6 ± 40               | 386.1 ± 83    | 70  |
| Hipotálamo                | 193.6 ± 16               | 228.6 ± 17    | 18  |
| Tálamo                    | 169.8 ± 17               | 419.6 ± 113*  | 47  |
| Giro Dentado              | 266.6 ± 30               | 426.1 ± 86*   | 60  |
| CA 1                      | 217.8 ± 30               | 302.3 ± 58    | 39  |
| CA 2                      | 190.4 ± 13               | 370.4 ± 64*   | 95  |
| CA 3                      | 226.1 ± 19               | 336.7 ± 26*   | 49  |
| Sustancia <i>nigra</i> PR | 164.1 ± 15               | 877.6 ± 292*  | 434 |
| Sustancia <i>nigra</i> PC | 158.8 ± 15 <sub>41</sub> | 437.5 ± 139*  | 69  |
| Sustancia GP              | 136.4 ± 30               | 449.5 ± 142*  | 230 |

regiones específicas del cerebro de ratas inmaduras sacrificadas 24 h después de inducirles CH (grupo CH24h), o de su manipulación (grupo CC24h).

| Grupos                    |            |               |     |
|---------------------------|------------|---------------|-----|
| Estructura                | CC24h      | CH24h         | %   |
| Cx del Cíngulo            | 424.8 ± 70 | 1447.4 ± 83** | 241 |
| Cx Frontal                | 639.7 ± 85 | 1074.2 ± 69** | 68  |
| Cx Parietal Anterior      | 677.1 ± 88 | 714.9 ± 78    | 6   |
| Cx Parietal Posterior     | 462.7 ± 68 | 831.8 ± 54**  | 80  |
| Cx Piriforme              | 334.8 ± 28 | 314.2 ± 22    | -6  |
| Cx Entorrinal             | 342.7 ± 16 | 463.0 ± 46*   | 35  |
| Cx Perirrinal             | 393.4 ± 20 | 494.7 ± 49*   | 26  |
| Cx Temporal               | 420.4 ± 57 | 598.3 ± 57*   | 42  |
| Estriado                  | 189.5 ± 16 | 235.0 ± 7*    | 24  |
| Núcleo Accumbens          | 245.4 ± 12 | 295.7 ± 12*   | 20  |
| AMG Basolateral           | 230.5 ± 21 | 348.8 ± 46*   | 51  |
| AMG Central               | 197.1 ± 22 | 260.5 ± 18*   | 32  |
| AMG Medial                | 224.6 ± 29 | 336.7 ± 17**  | 50  |
| Hipotálamo                | 232.3 ± 32 | 288.9 ± 22    | 24  |
| Tálamo                    | 281.9 ± 27 | 277.0 ± 19    | 2   |
| Giro Dentado              | 411.7 ± 42 | 500.6 ± 70    | 22  |
| CA 1                      | 562.1 ± 72 | 537.6 ± 76    | -4  |
| CA 2                      | 349.2 ± 33 | 337.6 ± 52    | -3  |
| CA 3                      | 472.7 ± 60 | 430.9 ± 70    | -9  |
| Sustancia <i>nigra</i> PR | 300.5 ± 32 | 337.6 ± 16    | 12  |
| Sustancia <i>nigra</i> PC | 247.5 ± 25 | 330.2 ± 20*   | 33  |
| Sustancia GP              | 282.7 ± 19 | 319.5 ± 17    | 13  |

Anotaciones como en la Tabla IV

Tabla VIII. Unión del [<sup>3</sup>H]muscimol expresada en fmol/mg proteína, en regiones específicas del cerebro de ratas inmaduras sacrificadas 20 días después de inducirles CH (grupo CH20d), o de su manipulación (grupo CC20d).

Anotaciones como en la Tabla IV.

Tabla IX. Unión del [<sup>3</sup>H]flunitracepam expresada en fmol/mg proteína, en

| Grupos                    |            |              |     |
|---------------------------|------------|--------------|-----|
| Estructura                | CC20d      | CH20d        | %   |
| Cx del Cíngulo            | 122.4 ± 21 | 397.0 ± 100* | 224 |
| Cx Frontal                | 92.2 ± 10  | 365.1 ± 82*  | 296 |
| Cx Parietal Anterior      | 137.4 ± 24 | 293.8 ± 62*  | 325 |
| Cx Parietal Posterior     | 110.6 ± 13 | 470.0 ± 93*  | 194 |
| Cx Piriforme              | 120.5 ± 25 | 254.5 ± 63*  | 111 |
| Cx Entorrinal             | 128.3 ± 16 | 268.3 ± 55*  | 109 |
| Cx Perirrinal             | 184.8 ± 26 | 360.1 ± 87*  | 95  |
| Cx Temporal               | 121.9 ± 8  | 322.8 ± 47*  | 164 |
| Estriado                  | 122.9 ± 26 | 159.6 ± 18   | 30  |
| Núcleo Accumbens          | 99.2 ± 16  | 213.8 ± 25*  | 115 |
| AMG Basolateral           | 115.6 ± 28 | 259.6 ± 50*  | 125 |
| AMG Central               | 76.1 ± 16  | 225.8 ± 39*  | 197 |
| AMG Medial                | 101.1 ± 24 | 270.8 ± 61*  | 168 |
| Hipotálamo                | 91.1 ± 15  | 253.5 ± 32*  | 178 |
| Tálamo                    | 139.6 ± 38 | 444.7 ± 70*  | 218 |
| Giro Dentado              | 139.6 ± 40 | 334.5 ± 40*  | 140 |
| CA 1                      | 108.5 ± 15 | 286.8 ± 52*  | 164 |
| CA 2                      | 98.5 ± 14  | 215.7 ± 20*  | 119 |
| CA 3                      | 105.7 ± 11 | 207.2 ± 14*  | 96  |
| Sustancia <i>nigra</i> PR | 115.8 ± 16 | 243.5 ± 25*  | 110 |
| Sustancia <i>nigra</i> PC | 117.3 ± 8  | 241.8 ± 43*  | 106 |
| Sustancia GP              | 125.5 ± 9  | 249.0 ± 32*  | 98  |

regiones específicas del cerebro de ratas inmaduras sacrificadas 20 días después de inducirles CH (grupo CH20d), o de su manipulación (grupo CC20d).

Anotaciones como en la Tabla IV.

| <b>Estructura</b>         | <b>Grupos</b> |              | <b>%</b> |
|---------------------------|---------------|--------------|----------|
|                           | <b>CC20d</b>  | <b>CH20d</b> |          |
| Cx del Cíngulo            | 335.6 ± 10    | 639.4 ± 67** | 91       |
| Cx Frontal                | 311.7 ± 29    | 536.0 ± 71*  | 72       |
| Cx Parietal Anterior      | 330.7 ± 31    | 513.2 ± 58*  | 70       |
| Cx Parietal Posterior     | 302.7 ± 27    | 450.3 ± 38*  | 36       |
| Cx Piriforme              | 283.9 ± 29    | 348.8 ± 51   | 22       |
| Cx Entorrinal             | 275.7 ± 19    | 334.8 ± 44   | 21       |
| Cx Perirrinal             | 321.4 ± 32    | 441.1 ± 89   | 37       |
| Cx Temporal               | 276.7 ± 15    | 324.2 ± 39   | 17       |
| Estriado                  | 185.0 ± 8     | 170.8 ± 20   | -8       |
| Núcleo Accumbens          | 169.5 ± 12    | 126.0 ± 6*   | -26      |
| AMG Basolateral           | 314.3 ± 23    | 359.7 ± 47   | 14       |
| AMG Central               | 244.1 ± 15    | 243.2 ± 39   | -0.4     |
| AMG Medial                | 261.6 ± 10    | 274.6 ± 34   | 5        |
| Hipotálamo                | 232.9 ± 8     | 223.2 ± 10   | -4       |
| Tálamo                    | 180.1 ± 13    | 174.8 ± 8    | -3       |
| Giro Dentado              | 291.5 ± 10    | 306.1 ± 39   | 5        |
| CA 1                      | 284.5 ± 17    | 317.0 ± 44   | 11       |
| CA 2                      | 278.6 ± 18    | 315.2 ± 38   | 13       |
| CA 3                      | 319.3 ± 21    | 376.3 ± 38   | 18       |
| Sustancia <i>nigra</i> PR | 201.6 ± 18    | 258.6 ± 19*  | 28       |
| Sustancia <i>nigra</i> PC | 287.9 ± 59    | 178.4 ± 28*  | -38      |
| Sustancia GP              | 191.8 ± 8     | 167.2 ± 13   | -13      |

Tabla X. Unión del [<sup>3</sup>H]muscimol expresada en fmol/mg proteína, en regiones específicas del cerebro de ratas inmaduras grupos, C30min y H30min, sacrificados después de la hipertermia.

| <b>Grupos</b>          |               |               |          |
|------------------------|---------------|---------------|----------|
| <b>Estructura</b>      | <b>C30min</b> | <b>H30min</b> | <b>%</b> |
| Cx. del Cíngulo        | 102.2 ± 6     | 724.1 ± 22**  | 608      |
| Cx. Frontal            | 110.1 ± 3     | 765.1 ± 21**  | 595      |
| Cx. Parietal Anterior  | 109.2 ± 3     | 742.1 ± 29**  | 579      |
| Cx. Parietal Posterior | 104.7 ± 4     | 793.1 ± 27**  | 656      |
| Cx. Piriforme          | 95.7 ± 4      | 702.3 ± 16**  | 633      |
| Cx. Entorrinal         | 100.5 ± 4     | 696.0 ± 31**  | 592      |
| Cx. Perirrinal         | 102.9 ± 4     | 733.7 ± 11**  | 612      |
| CX. Temporal           | 110.2 ± 2     | 589.3 ± 94**  | 434      |
| Estriado               | 95.5 ± 4      | 642.9 ± 29**  | 573      |
| Núcleo Accumbens       | 92.1 ± 5      | 598.6 ± 36**  | 549      |
| AMG Basolateral        | 99.1 ± 5      | 736.6 ± 26**  | 643      |
| AMG Central            | 96.5 ± 3      | 675.2 ± 12**  | 599      |
| AMG Medial             | 95.2 ± 4      | 647.4 ± 32**  | 580      |
| Hipotálamo             | 105.8 ± 17    | 565.6 ± 35**  | 434      |
| Tálamo                 | 95.9 ± 5      | 620.9 ± 34**  | 547      |
| Giro Dentado           | 96.2 ± 5      | 650.6 ± 41**  | 576      |
| Área CA 1              | 97.4 ± 3      | 636.3 ± 30**  | 552      |
| Área CA 2              | 95.2 ± 4      | 628.2 ± 19**  | 559      |
| Área CA 3              | 94.2 ± 3      | 590.2 ± 43**  | 526      |
| Sustancia nigra PR     | 95.4 ± 4      | 646.5 ± 24**  | 577      |
| Sustancia nigra PC     | 95.9 ± 5      | 574.6 ± 50**  | 498      |
| Sustancia GP           | 97.5 ± 4      | 603.1 ± 33**  | 518      |

Anotaciones como en la Tabla IV.

Tabla XI. Unión del [<sup>3</sup>H]flunitracepam expresada en fmol/mg proteína, en regiones específicas del cerebro de ratas inmaduras grupos, C30min y H30min, sacrificados después de la hipertermia.

Anotaciones como en la Tabla IV.

| <b>Grupos</b>          |               |               |          |
|------------------------|---------------|---------------|----------|
| <b>Estructura</b>      | <b>C30min</b> | <b>H30min</b> | <b>%</b> |
| Cx. del Cíngulo        | 358.0 ± 21    | 511.5 ± 44*   | 45       |
| Cx. Frontal            | 396.1 ± 40    | 507.8 ± 10*   | 28       |
| Cx. Parietal Anterior  | 319.7 ± 27    | 433.9 ± 38*   | 36       |
| Cx. Parietal Posterior | 356.6 ± 33    | 624.8 ± 67*   | 74       |
| Cx. Piriforme          | 273.4 ± 13    | 512.7 ± 32*   | 87       |
| Cx. Entorrinal         | 232.9 ± 19    | 680.8 ± 73**  | 192      |
| Cx. Perirrinal         | 288.6 ± 17    | 632.9 ± 87*   | 119      |
| CX. Temporal           | 248.5 ± 29    | 944.6 ± 220*  | 280      |
| Estriado               | 223.2 ± 10    | 389.2 ± 59*   | 74       |
| Núcleo Accumbens       | 186.6 ± 21    | 458.5 ± 51*   | 145      |
| AMG Basolateral        | 305.5 ± 32    | 507.4 ± 41*   | 66       |
| AMG Central            | 234.4 ± 23    | 410.3 ± 51*   | 75       |
| AMG Medial             | 288.7 ± 14    | 650.4 ± 65*   | 125      |
| Hipotálamo             | 245.2 ± 18    | 561.1 ± 62*   | 128      |
| Tálamo                 | 241.7 ± 13    | 672.4 ± 101*  | 178      |
| Giro Dentado           | 265.2 ± 12    | 651.6 ± 89*   | 145      |
| Área CA 1              | 260.1 ± 15    | 916.6 ± 228** | 252      |
| Área CA 2              | 255.7 ± 19    | 661.9 ± 118*  | 158      |
| Área CA 3              | 292.5 ± 12    | 768.3 ± 197*  | 162      |
| Sustancia nigra PR     | 226.5 ± 16    | 551.4 ± 34**  | 143      |
| Sustancia nigra PC     | 234.1 ± 15    | 474.2 ± 48*   | 102      |
| Sustancia GP           | 192.0 ± 12    | 489.4 ± 105*  | 154      |

Tabla XII. Unión del [<sup>3</sup>H]muscimol expresada en fmol/mg proteína, en regiones específicas del cerebro de ratas inmaduras grupos, C24h y H24h, sacrificados después de la hipertermia.

Anotaciones como en la Tabla IV.

| Estructura             | Grupos     |               | %   |
|------------------------|------------|---------------|-----|
|                        | C24h       | H24h          |     |
| Cx. del Cíngulo        | 177.8 ± 17 | 636.4 ± 40**  | 257 |
| Cx. Frontal            | 184.7 ± 16 | 618.6 ± 74**  | 234 |
| Cx. Parietal Anterior  | 182.1 ± 14 | 724.1 ± 32**  | 297 |
| Cx. Parietal Posterior | 184.8 ± 26 | 775.3 ± 35**  | 319 |
| Cx. Piriforme          | 162.4 ± 23 | 635.6 ± 45**  | 291 |
| Cx. Entorrinal         | 182.1 ± 17 | 675.1 ± 64**  | 271 |
| Cx. Perirrinal         | 184.2 ± 19 | 614.0 ± 69**  | 233 |
| CX. Temporal           | 193.3 ± 19 | 675 .1 ± 64** | 270 |
| Estriado               | 188.5 ± 7  | 454.6 ± 81**  | 141 |
| Núcleo Accumbens       | 163.8 ± 21 | 615.1 ± 85**  | 275 |
| AMG Basolateral        | 175.8 ± 19 | 566.2 ± 67**  | 322 |
| AMG Central            | 174.9 ± 18 | 640.5 ± 78**  | 266 |
| AMG Medial             | 176.6 ± 19 | 543.3 ± 95**  | 207 |
| Hipotálamo             | 173.1 ± 15 | 596.2 ± 78**  | 244 |
| Tálamo                 | 184.3 ± 12 | 648.6 ± 95**  | 251 |
| Giro Dentado           | 200.6 ± 11 | 555.2 ± 79**  | 318 |
| Área CA 1              | 174.9 ± 22 | 614.5 ± 62**  | 184 |
| Área CA 2              | 145.6 ± 29 | 609.5 ± 74**  | 318 |
| Área CA 3              | 202.1 ± 12 | 576.1 ± 82**  | 184 |
| Sustancia nigra PR     | 196.2 ± 11 | 743.2 ± 54**  | 278 |
| Sustancia nigra PC     | 185.8 ± 14 | 624.1 ± 90**  | 235 |
| Sustancia GP           | 194.6 ± 8  | 544.6 ± 48**  | 179 |

Tabla XIII. Unión del [<sup>3</sup>H]flunitracepam expresada en fmol/mg proteína, en regiones específicas del cerebro de ratas inmaduras grupos, C24h y H24h, sacrificados después de la hipertermia.

Anotaciones como en la Tabla IV.

| Estructura             | Grupos      |             | %  |
|------------------------|-------------|-------------|----|
|                        | C24h        | H24h        |    |
| Cx. del Cíngulo        | 474.6 ± 84  | 704.3 ± 44* | 48 |
| Cx. Frontal            | 395.4 ± 41  | 657.3 ± 41* | 66 |
| Cx. Parietal Anterior  | 427.9 ± 39  | 307.5 ± 16* | 28 |
| Cx. Parietal Posterior | 404.8 ± 15  | 331.9 ± 31* | 20 |
| Cx. Piriforme          | 350.7 ± 14  | 495.9 ± 48* | 48 |
| Cx. Entorrinal         | 537.1 ± 98  | 595.3 ± 119 | 10 |
| Cx. Perirrinal         | 484.6 ± 117 | 786.9 ± 57* | 62 |
| CX. Temporal           | 593.5 ± 85  | 700.4 ± 56  | 18 |
| Estriado               | 309.3 ± 50  | 391.4 ± 70  | 26 |
| Núcleo Accumbens       | 274.1 ± 11  | 432.6 ± 73* | 57 |
| AMG Basolateral        | 291.9 ± 14  | 368.2 ± 49  | 26 |
| AMG Central            | 336.1 ± 18  | 486.9 ± 53* | 44 |
| AMG Medial             | 422.9 ± 105 | 438.7 ± 57  | 4  |
| Hipotálamo             | 276.4 ± 10  | 440.3 ± 71* | 59 |
| Tálamo                 | 344.9 ± 29  | 426.2 ± 69  | 24 |
| Giro Dentado           | 428.2 ± 48  | 681.3 ± 54* | 59 |
| Área CA 1              | 523.8 ± 76  | 731.6 ± 38* | 39 |
| Área CA 2              | 335.2 ± 17  | 614.3 ± 65* | 83 |
| Área CA 3              | 413.9 ± 35  | 702.2 ± 56* | 69 |
| Sustancia nigra PR     | 345.1 ± 42  | 516.6 ± 57* | 49 |
| Sustancia nigra PC     | 324.3 ± 23  | 311.6 ± 54  | 96 |
| Sustancia GP           | 303.4 ± 20  | 504.9 ± 68* | 66 |

Tabla XIV. Unión del [<sup>3</sup>H]muscimol expresada en fmol/mg proteína, en regions específicas del cerebro de ratas inmaduras grupos, C20d y H20d, sacrificados después de la hipertemia.

Anotaciones como en la Tabla IV.

| <b>Grupos</b>          |             |             |          |
|------------------------|-------------|-------------|----------|
| <b>Estructura</b>      | <b>C20d</b> | <b>H20d</b> | <b>%</b> |
| Cx. del Cíngulo        | 267.8 ± 48  | 620.2 ± 97* | 131      |
| Cx. Frontal            | 272.5 ± 48  | 721.3 ± 72* | 164      |
| Cx. Parietal Anterior  | 273.3 ± 46  | 610.3 ± 97* | 123      |
| Cx. Parietal Posterior | 286.3 ± 33  | 681.3 ± 78* | 137      |
| Cx. Piriforme          | 263.8 ± 35  | 433.4 ± 73* | 64       |
| Cx. Entorrinal         | 279.9 ± 34  | 575.5 ± 79* | 105      |
| Cx. Perirrinal         | 266.3 ± 40  | 496.1 ± 57* | 86       |
| CX. Temporal           | 309.2 ± 48  | 720.0 ± 84* | 132      |
| Estriado               | 231.5 ± 36  | 480.8 ± 80* | 107      |
| Núcleo Accumbens       | 222.7 ± 25  | 476.3 ± 69* | 113      |
| AMG Basolateral        | 248.5 ± 30  | 383.2 ± 42* | 54       |
| AMG Central            | 235.2 ± 27  | 401.8 ± 51* | 70       |
| AMG Medial             | 251.6 ± 36  | 404.0 ± 46* | 60       |
| Hipotálamo             | 232.7 ± 34  | 384.1 ± 58* | 64       |
| Tálamo                 | 247.9 ± 32  | 557.9 ± 66* | 125      |
| Giro Dentado           | 240.6 ± 29  | 501.2 ± 53* | 108      |
| Área CA 1              | 263.8 ± 36  | 481.3 ± 66* | 82       |
| Área CA 2              | 242.9 ± 37  | 485.7 ± 53* | 99       |
| Área CA 3              | 246.8 ± 28  | 473.7 ± 48* | 91       |
| Sustancia nigra PR     | 272.3 ± 38  | 603.6 ± 58* | 121      |
| Sustancia nigra PC     | 256.4 ± 27  | 529.7 ± 74* | 106      |
| Sustancia GP           | 260.7 ± 32  | 534.6 ± 50* | 105      |

Tabla XV. Unión del [<sup>3</sup>H]flunitracepam expresada en fmol/mg proteína, en regions específicas del cerebro de ratas inmaduras grupos, C20d y H20d, sacrificados después de la hipertermia.

Anotaciones como en la Tabla IV.

| <b>Grupos</b>          |             |              |          |
|------------------------|-------------|--------------|----------|
| <b>Estructura</b>      | <b>C20d</b> | <b>H20d</b>  | <b>%</b> |
| Cx. del Cíngulo        | 321.6 ± 18  | 487.1 ± 64*  | 51       |
| Cx. Frontal            | 312.7 ± 14  | 339.6 ± 14   | 8        |
| Cx. Parietal Anterior  | 314.5 ± 7   | 339.1 ± 25   | 7        |
| Cx. Parietal Posterior | 291.8 ± 16  | 336.5 ± 31   | 15       |
| Cx. Piriforme          | 278.4 ± 19  | 536.7 ± 78*  | 92       |
| Cx. Entorrinal         | 305.8 ± 15  | 497.5 ± 81*  | 62       |
| Cx. Perirrinal         | 314.4 ± 20  | 615.9 ± 84*  | 93       |
| CX. Temporal           | 296.1 ± 23  | 588.6 ± 90*  | 98       |
| Estriado               | 216.4 ± 8   | 508.0 ± 110* | 135      |
| Núcleo Accumbens       | 232.7 ± 11  | 376.6 ± 67*  | 61       |
| AMG Basolateral        | 244.8 ± 21  | 555.6 ± 139* | 127      |
| AMG Central            | 270.1 ± 16  | 579.4 ± 61*  | 114      |
| AMG Medial             | 287.2 ± 19  | 501.1 ± 82*  | 74       |
| Hipotálamo             | 231.2 ± 19  | 265.0 ± 46   | 14       |
| Tálamo                 | 225.4 ± 11  | 287.2 ± 48   | 27       |
| Giro Dentado           | 298.9 ± 17  | 429.7 ± 36*  | 43       |
| Área CA 1              | 289.9 ± 14  | 526.1 ± 50*  | 81       |
| Área CA 2              | 277.2 ± 16  | 498.6 ± 59*  | 80       |
| Área CA 3              | 286.3 ± 20  | 459.1 ± 30*  | 60       |
| Sustancia nigra PR     | 238.6 ± 7   | 558.5 ± 115* | 134      |
| Sustancia nigra PC     | 213.2 ± 10  | 525.1 ± 97*  | 146      |
| Sustancia GP           | 277.1 ± 9   | 582.8 ± 130* | 110      |

## **7.6 Efecto de las crisis hipertérmicas en el contenido tisular de aminoácidos**

Se analizó si animales expuestos a CH presentan un aumento en el contenido tisular de aminoácidos inhibitorios y excitatorios a corto y largo plazo, efectos semejantes a los observados en ratas adultas con crisis epilépticas por el “kindling” y AK. La concentración de aminoácidos inhibitorios y excitatorios se cuantificó a los 30 min, 24 h y 20 días después de inducir crisis convulsivas con hipertermia en áreas cerebrales específicas de ratas de 10 días de edad, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

### **7.6.1 Contenido tisular de aminoácidos 30 min después de las CH**

El análisis cromatográfico mostró que en comparación al grupo control el grupo CH30min presentó en el hipocampo un aumento significativo en el contenido tisular de la glicina (14%) y taurina (114%), así como una disminución significativa en la alanina (26%), el aspartato (51%) y la glutamina (42%). La corteza mostró un incremento significativo en la concentración de alanina (29%), GABA (64%), glutamina (1371%), glutamato (739%) y de glicina (1493%). La amígdala exhibió un aumento significativo de alanina (46%), GABA (178%), glutamina (78%), glutamato (996%), glicina (3661%) y taurina (1036%). En el estriado se mostró un incremento significativo en el aspartato (136%), GABA (50%), glutamato (30%) y glicina (52%), así como una disminución significativa en el glutamato (57%). El tallo cerebral presentó una elevación de alanina (109%), aspartato (83%), GABA (34%), glutamina (29%), glicina (114%) y

taurina (55%). En el cerebelo se observó un aumento significativo en el aspartato (355%), GABA (267%), glutamina (83%), glutamato (72%), glicina (443%) y taurina (83%) (Figuras 18-21, Tabla XVI).

### **7.6.2 Contenido tisular de aminoácidos 24 h después de las CH**

El grupo CH24h presentó en el hipocampo un aumento significativo del glutamato (509%), así como una disminución significativa en la alanina (51%), el aspartato (48%), GABA (42%), glutamina (65%), glicina (37%) y taurina (59%). La corteza mostró un decremento significativo en la concentración de alanina (30%), GABA (61%), glutamina (24%), glutamato (36%) y taurina (46%). La amígdala exhibió un aumento significativo de alanina (22%), aspartato (92%) y de glutamato (26%), además una disminución significativa de glutamina (21%). En el estriado se demostró un incremento significativo en la glutamina (20%), en la glicina (71%) y en la taurina (74%) y una disminución significativa en la alanina (38%), aspartato (29%), GABA (51%) y glutamato (41%). El tallo cerebral presentó una elevación de GABA (21%), glutamina (77%), glutamato (52%), glicina (60%) y taurina (55%) y una disminución en el aspartato (31%). En el cerebelo se observó un aumento significativo de aspartato (30%), así como un decremento significativo en la alanina (61%), GABA (85%), glutamina (53%), glutamato (28%), glicina (42%) y taurina (21%) (Figuras 18-21, Tabla XVII).

### **7.6.3 Contenido tisular de aminoácidos 20 días después de las CH**

El grupo CH20d, mostró en el hipocampo un aumento significativo del contenido tisular del aspartato (40%), glutamina (58%), glutamato (110%) y de taurina (38%), así como una disminución significativa en la alanina (49%) y de glicina (34%). La corteza mostró un incremento significativo en el aspartato (133%), GABA (108%),

glutamato (13%) y de glicina (19%), también una disminución significativa en la concentración de alanina (33%) y de taurina (8%). La amígdala exhibió un aumento significativo de alanina (72%), aspartato (47%), GABA (222%), glicina (70%) y una disminución del glutamato (20%). En el estriado se demostró un incremento significativo en la alanina (52%), aspartato (70%), GABA (147%), glutamina (40%), glutamato (39%), glicina (147%) y taurina (58%). El tallo cerebral presentó una elevación del aspartato (109%) y de glutamina (12%). En el cerebelo se observó un incremento significativo en la alanina (182%), aspartato (299%), GABA (150%), glutamina (99%), glutamato (23%), glicina (287%) y taurina (93%) (Figuras 18-21, Tabla XVIII).



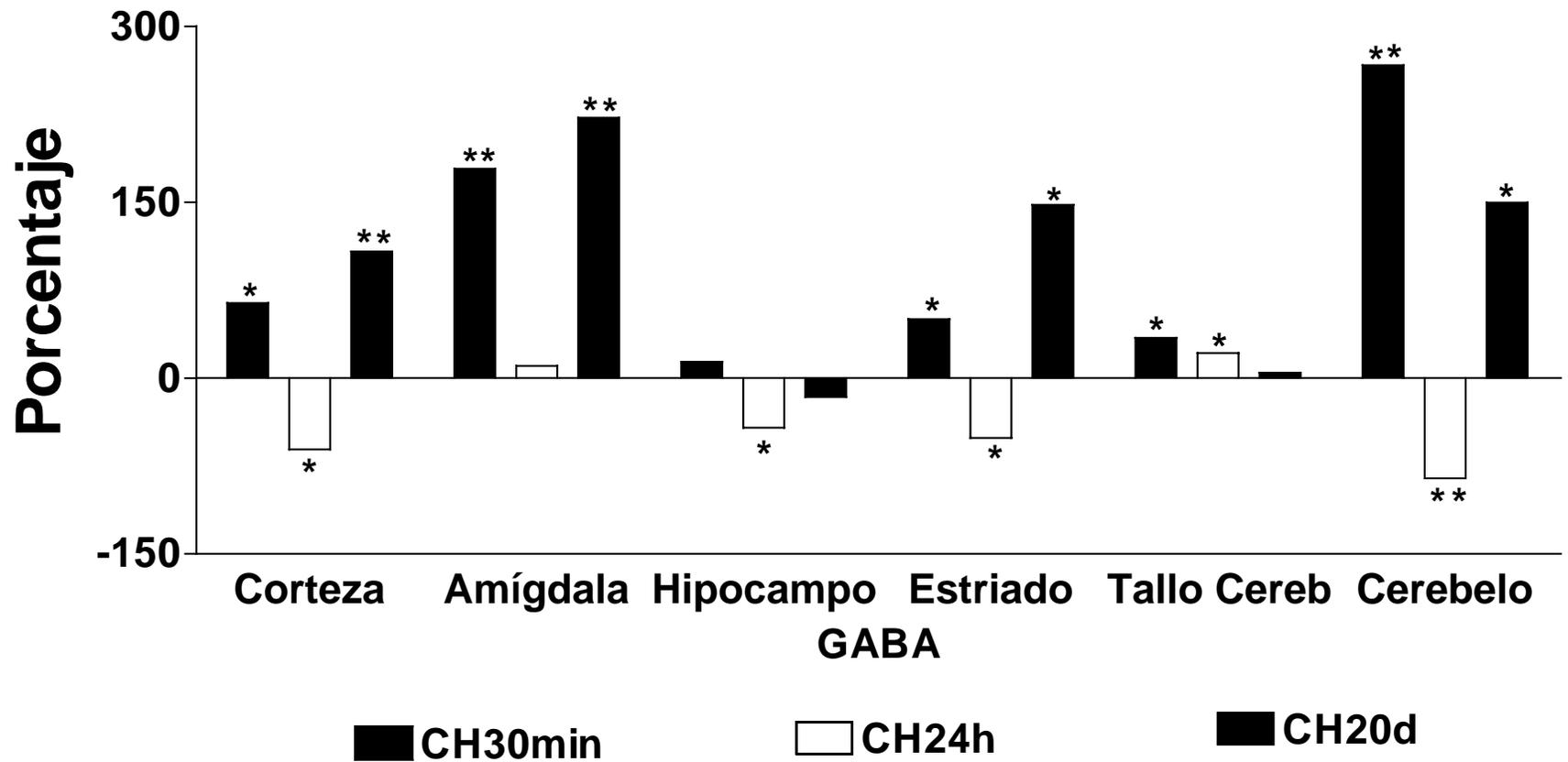


Figura 22. Porcentaje de cambio con respecto a su grupo control en la concentración del contenido tisular de GABA en diferentes regiones del cerebro de ratas inmaduras sacrificadas a los 30 min (CH30min), 24 h (CH24h) y 20 días (CH20d) después de haber sido sometidas a CH. Los valores representan la media  $\pm$  EE de 10 animales. *t* Student's \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

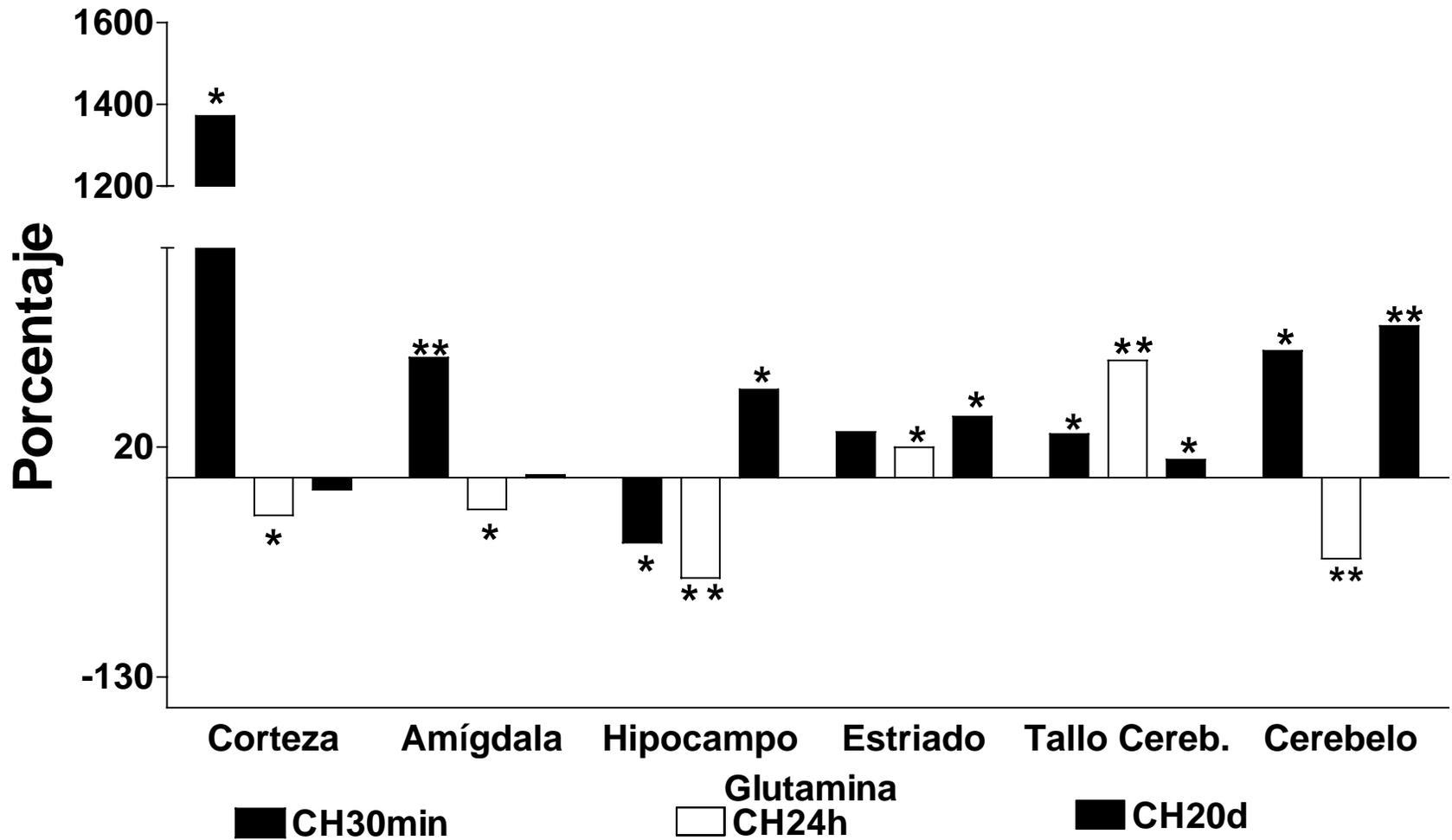


Figura 23. Porcentaje de cambio con respecto a su grupo control en la concentración del contenido tisular de Glutamina en diferentes regiones del cerebro de ratas inmaduras sacrificadas a los 30 min (CH30min), 24 h (CH24h) y 20 días (CH20d) después de ser sometidas a CH. Los valores representan la media  $\pm$  EE de 10 animales por grupo. *t* Student's. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

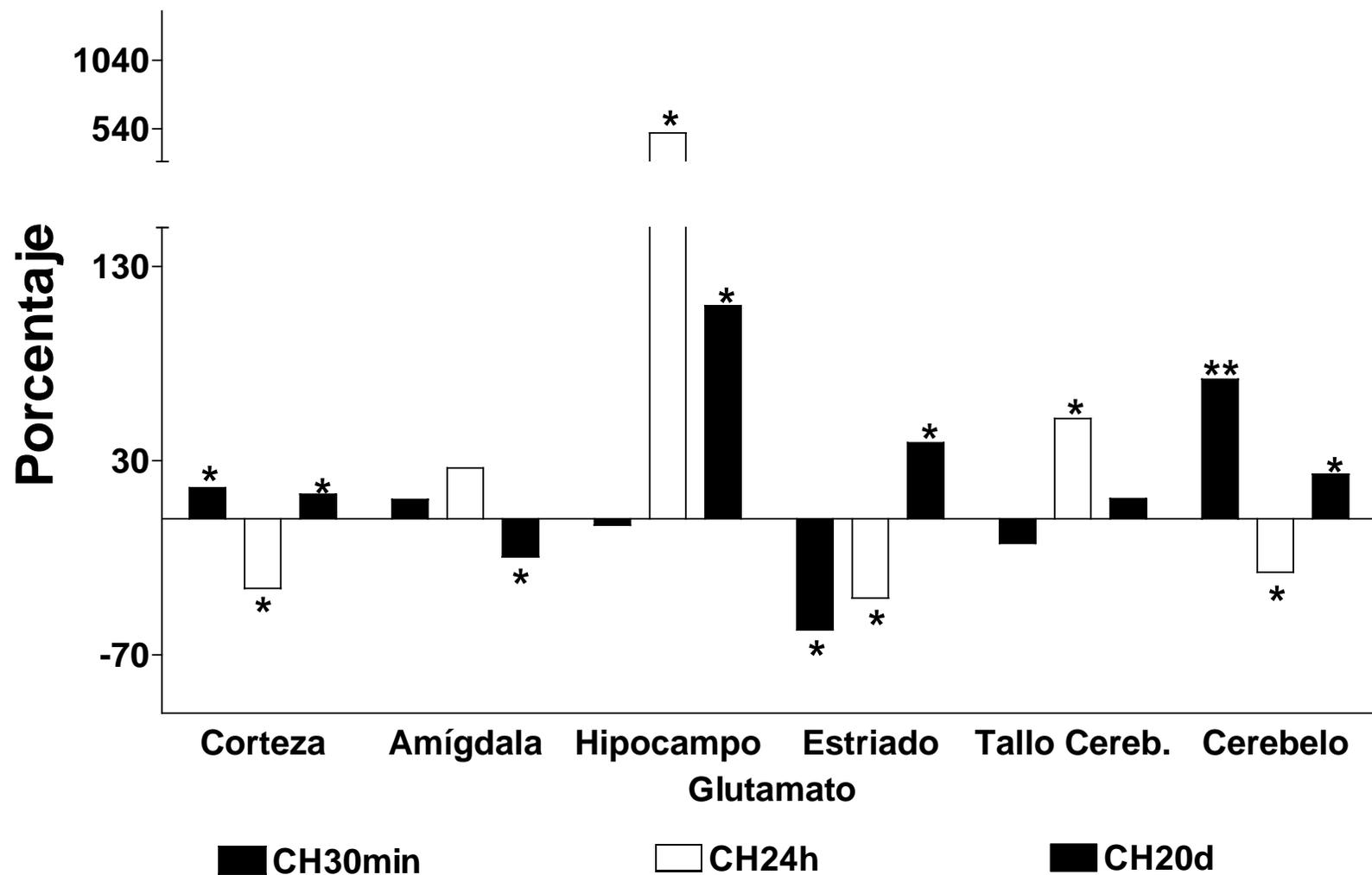


Figura 24. Porcentaje de cambio con respecto a su grupo control en la concentración del contenido tisular de Glutamato en diferentes regiones del cerebro de ratas inmaduras sacrificadas a los 30 min (CH30min), 24 h (CH24h) y 20 días (CH20d) después de ser sometidas a CH. Los valores representan la media  $\pm$  EE de 10 animales por grupo. *t* Student's \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

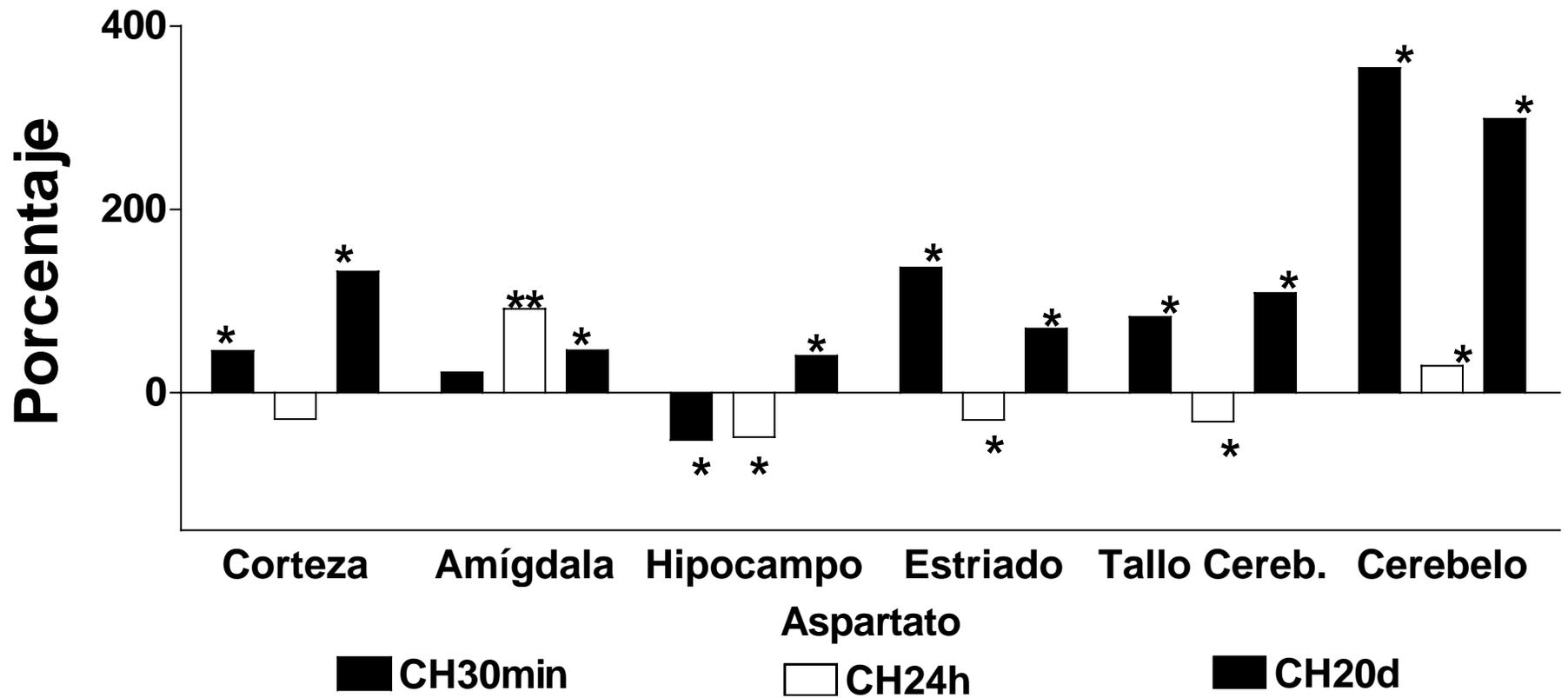


Figura 25. Porcentaje de cambio con respecto a su grupo control en la concentración del contenido tisular de Aspartato en diferentes regiones del cerebro de ratas inmaduras sacrificadas a los 30 min (CH30min), 24 h (CH24h) y 20 días (CH20d) después de ser sometidas a CH. Los valores representan la media  $\pm$  EE de 10 animales. *t* Student's \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

Tabla XVI. Contenido tisular expresado en ng/mg de proteína de aminoácidos inhibitorios y excitatorios en diferentes regiones cerebrales de ratas inmaduras sacrificadas 30 min después de inducirles CH (grupo CH30min), o de su manipulación (grupo CC30min).

|                       |         | <b>Ala</b>      | <b>Asp</b>      | <b>GABA</b>     | <b>Gln</b>       | <b>Glu</b>      | <b>Gly</b>       | <b>Tau</b>       |
|-----------------------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|
| <b>Corteza</b>        | CC30min | 1678.0 ± 132.4  | 1009.9 ± 76.5   | 826.1 ± 65.1    | 237.3 ± 25.9     | 3656.0 ± 183.0  | 101.8 ± 11.1     | 10160.6 ± 180.8  |
|                       | CH30min | 2162.3 ± 109.5* | 1538.6 ± 186.3* | 1353.6 ± 122.4* | 3492.0 ± 403.5*  | 3069.0 ± 196.9* | 1622.2 ± 106.7** | 10539.0 ± 778.7  |
| <b>Hipocampo</b>      | CC30min | 1849.9 ± 102.9  | 1413.5 ± 114.8  | 262.8 ± 47.6    | 4087.4 ± 69.7    | 2573.6 ± 213.3  | 1420.1 ± 38.0    | 2606.3 ± 41.2    |
|                       | CH30min | 1361.4 ± 23.1*  | 689.6 ± 61.3*   | 299.4 ± 40.4    | 2365.8 ± 128.8*  | 2489.0 ± 89.8   | 1622.8 ± 37.8*   | 5569.9 ± 186.4** |
| <b>Estriado</b>       | CC30min | 1124.7 ± 121.0  | 357.9 ± 20.4    | 739.8 ± 17.7    | 1730.3 ± 228.5   | 3197.4 ± 49.7   | 690.3 ± 68.9     | 4374.5 ± 227.8   |
|                       | CH30min | 1020.4 ± 34.9   | 846.7 ± 8.6*    | 1112.2 ± 7.2*   | 2248.4 ± 110.5   | 1826.7 ± 77.9*  | 1049.7 ± 70.8*   | 4500.0 ± 182.6   |
| <b>Tallo Cerebral</b> | CC30min | 602.4 ± 36.4    | 730.3 ± 36.2    | 863.0 ± 39.7    | 2344.0 ± 114.9   | 3096.1 ± 77.1   | 999.3 ± 46.0     | 3475.0 ± 203.3   |
|                       | CH30min | 1260.8 ± 51.1*  | 1338.8 ± 112.9* | 1158.4 ± 12.9*  | 3013.2 ± 135.8*  | 2706.2 ± 183.8  | 2134.9 ± 170.2*  | 5374.6 ± 235.4*  |
| <b>Cerebelo</b>       | CC30min | 1144.2 ± 53.4   | 400.7 ± 57.6    | 381.0 ± 35.8    | 2071.2 ± 106.7   | 2051.0 ± 145.4  | 520.8 ± 20.1     | 4745.1 ± 245.1   |
|                       | CH30min | 1150.4 ± 51.6   | 1821.3 ± 123.3* | 1397.4 ± 80.1** | 3787.8 ± 103.6** | 3526.0 ± 79.4** | 2305.5 ± 77.9**  | 8676.0 ± 380.2*  |
| <b>Amígdala</b>       | CC30min | 1064.3 ± 62.4   | 1271.0 ± 111.2  | 392.6 ± 46.2    | 1839.5 ± 87.1    | 2239.0 ± 158.0  | 40.4 ± 3.3       | 534.1 ± 35.1     |
|                       | CH30min | 1548.5 ± 57.7*  | 1551.5 ± 114.9  | 1093.3 ± 47.2** | 3282.7 ± 150.4** | 2454.7 ± 119.1  | 1519.6 ± 77.5**  | 6068.9 ± 264.5** |

Los valores son la media ± EE de 7 animales. Ala, Alanina; Asp, Aspartato; GABA, Ácido  $\gamma$ -aminobutírico; Gln, Glutamina; Glu, Glutamato; Gly, Glicina; Tau, Taurina. *t* Student's, \**p*<0.05; \*\**p*<0.01

Tabla XVII. Contenido tisular expresado en ng/mg de proteína de aminoácidos inhibitorios y excitatorios en diferentes regiones cerebrales de ratas inmaduras sacrificadas 24 horas después de inducirles CH (grupo CH24h), o de su manipulación (grupoCC24h).

|                       |       | <b>Ala</b>      | <b>Asp</b>     | <b>GABA</b>    | <b>Gln</b>       | <b>Glu</b>        | <b>Gly</b>       | <b>Tau</b>        |
|-----------------------|-------|-----------------|----------------|----------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| <b>Corteza</b>        | CC24h | 2266.8 ± 105.6  | 2243.7 ± 204.6 | 1293.8 ± 110.1 | 4168.0 ± 227.6   | 8060.5 ± 380.4    | 591.6 ± 54.1     | 16409.4 ± 707.6   |
|                       | CH24h | 1586.2 ± 125.6* | 1604.4 ± 191.1 | 507.5 ± 53.6*  | 3151.8 ± 285.8** | 5183.5 ± 662.3*   | 733.9 ± 51.8     | 8878.6 ± 510.9*   |
| <b>Hipocampo</b>      | CC24h | 1473.0 ± 81.5   | 1947.4 ± 124.1 | 551.1 ± 40.1   | 4717.5 ± 195.4   | 584.8 ± 39.3      | 719.0 ± 48.7     | 10645.3 ± 232.0   |
|                       | CH24h | 725.3 ± 71.0*   | 1004.3 ± 39.3* | 318.0 ± 7.2*   | 1642.1 ± 77.1**  | 3559.5 ± 153.9*** | 453.2 ± 25.1     | 4354.5 ± 163.8*** |
| <b>Estriado</b>       | CC24h | 1437.8 ± 143.0  | 1088.3 ± 152.2 | 1479.6 ± 84.8  | 1529.3 ± 95.6    | 2861.0 ± 154.1    | 490.6 ± 39.5     | 2376.2 ± 133.2    |
|                       | CH24h | 896.7 ± 30.3*   | 769.2 ± 150.4* | 726.8 ± 71.9*  | 1836.8 ± 141.2** | 1693.1 ± 133.5**  | 840.3 ± 102.0*   | 4137.6 ± 197.0**  |
| <b>Tallo Cerebral</b> | CC24h | 945.0 ± 57.2    | 1817.7 ± 120.0 | 1237.1 ± 69.4  | 2096.2 ± 146.0   | 2379.3 ± 110.4    | 1101.1 ± 87.0    | 3794.8 ± 116.8    |
|                       | CH24h | 1010.1 ± 71.8   | 1250.1 ± 86.5* | 1500.6 ± 17.2* | 3704.7 ± 182.2** | 3607.7 ± 123.9**  | 1764.9 ± 113.6** | 5631.3 ± 249.0**  |
| <b>Cerebelo</b>       | CC24h | 2979.4 ± 263.0  | 520.3 ± 53.1   | 2426.8 ± 171.7 | 5416.3 ± 155.4   | 3864.0 ± 154.9    | 1245.2 ± 48.0    | 6595.9 ± 126.3    |
|                       | CH24h | 1155.9 ± 120.7* | 674.1 ± 45.6*  | 354.3 ± 28.5** | 2560.3 ± 182.3** | 2803.2 ± 156.9*   | 718.6 ± 62.6**   | 5200.6 ± 268.4*   |
| <b>Amígdala</b>       | CC24h | 1236.3 ± 74.2   | 784.3 ± 82.5   | 486.1 ± 24.2   | 1759.7 ± 146.4   | 3196.6 ± 260.9    | 389.9 ± 30.5     | 6986.4 ± 422.4    |
|                       | CH24h | 1511.1 ± 46.6*  | 1503 ± 21.8**  | 536.0 ± 23.0   | 1398.2 ± 68.1*   | 4036.0 ± 36.1*    | 442.8 ± 24.0     | 6278.2 ± 758.6    |

Anotaciones como en la Tabla VI.

Tabla XVIII. Contenido tisular expresado en ng/mg de proteína de aminoácidos inhibitorios y excitatorios en diferentes regiones cerebrales de ratas inmaduras, sacrificadas 20 días después de inducirles CH (grupo CH20d), o de su manipulación (CC20d).

|                       |       | <b>Ala</b>      | <b>Asp</b>       | <b>GABA</b>      | <b>Gln</b>       | <b>Glu</b>       | <b>Gly</b>       | <b>Tau</b>       |
|-----------------------|-------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>Corteza</b>        | CC20d | 950.1 ± 29.7    | 2744.5 ± 89.2    | 1097.4 ± 44.4    | 3957.3 ± 248.4   | 9409.5 ± 151.9   | 824.1 ± 21.3     | 5474.5 ± 180.1   |
|                       | CH20d | 640.8 ± 23.1*   | 6384.6 ± 155.0** | 2281.5 ± 105.4** | 3661.2 ± 146.2   | 10602.6 ± 262.1* | 978.0 ± 59.4*    | 5037.6 ± 154.2*  |
| <b>Hipocampo</b>      | CC20d | 725.3 ± 73.0    | 2073.5 ± 103.1   | 1270.1 ± 135.4   | 1703.3 ± 156.5   | 2375.5 ± 213.9   | 520.7 ± 26.1     | 2262.5 ± 247.5   |
|                       | CH20d | 371.4 ± 27.3*   | 2911.5 ± 187.1** | 1066.6 ± 84.5    | 2685.5 ± 244.4** | 4983.0 ± 208.5*  | 342.0 ± 53.7*    | 3128.0 ± 98.9*   |
| <b>Estriado</b>       | CC20d | 884.9 ± 16.7    | 2416.4 ± 176.1   | 1222.1 ± 148.0   | 2095.7 ± 180.1   | 2956.5 ± 246.7   | 523.8 ± 68.3     | 2723.4 ± 172.3   |
|                       | CH20d | 1348.5 ± 86.4*  | 4114.8 ± 236.0*  | 3028.8 ± 169.5*  | 2935.1 ± 134.9*  | 4114.7 ± 77.0*   | 1298.4 ± 88.1**  | 4310.7 ± 92.2**  |
| <b>Tallo Cerebral</b> | CC20d | 613.3 ± 17.2    | 3082.3 ± 238.7   | 1574.8 ± 170.0   | 2662.5 ± 68.6    | 4241.1 ± 256.3   | 1437.9 ± 130.9   | 2082.7 ± 172.4   |
|                       | CH20d | 572.4 ± 18.0    | 6441.0 ± 222.6** | 1647.6 ± 119.9   | 2982.0 ± 92.5*   | 4688.0 ± 213.8   | 1470.0 ± 259.7   | 1966.8 ± 193.3   |
| <b>Cerebelo</b>       | CC20d | 606.7 ± 22.1    | 1670.2 ± 105.9   | 1131.9 ± 199.5   | 3300.3 ± 125.9   | 5278.1 ± 213.0   | 577.5 ± 114.7    | 3193.7 ± 252.7   |
|                       | CH20d | 1708.2 ± 176.4* | 6660.0 ± 308.5** | 2826.5 ± 209.0*  | 6571.8 ± 202.4** | 6492.8 ± 384.2*  | 2233.8 ± 207.1** | 6173.4 ± 203.6** |
| <b>Amígdala</b>       | CC20d | 656.6 ± 33.9    | 2022.1 ± 334.6   | 776.8 ± 44.2     | 4025.5 ± 255.2   | 5360.7 ± 249.0   | 846.8 ± 144.7    | 3679.6 ± 276.5   |
|                       | CH20d | 1130.7 ± 65.8** | 2962.5 ± 109.1** | 2501.4 ± 174.3*  | 4107.8 ± 163.9   | 4307.7 ± 172.1*  | 1437.1 ± 78.3*   | 4074.4 ± 115.2   |

Anotaciones como en la Tabla VI.

## **8. Discusión**

En el presente estudio se encontró que las crisis hipertérmicas así como, la exposición a hipertermia sin producción de crisis convulsivas, modifican la susceptibilidad a las crisis inducidas por PTZ, la unión del GABA y las BDZ al receptor GABA<sub>A</sub> y el contenido tisular de aminoácidos excitatorios e inhibitorios en áreas cerebrales específicas. Sin embargo, los datos obtenidos no corroboran la hipótesis de que la producción de crisis hipertérmicas inducen cambios a largo plazo, similares a los observados en modelos experimentales de epilepsia del lóbulo temporal en animales adultos.

### **8.1 Efecto de las crisis hipertérmicas y la hipertermia en la susceptibilidad al PTZ**

En cuanto a la susceptibilidad a las crisis por PTZ en animales inmaduros previamente expuestos a crisis hipertérmicas, se observó lo siguiente: la administración de PTZ 30 min después de crisis hipertérmicas produjo un menor porcentaje de animales que presentaron crisis clónicas, tónicas y muerte inducidas por este convulsivante, aunque la latencia a dichas crisis fue menor. 24 h después de haber presentado crisis hipertérmicas, se observó un decremento en el porcentaje de animales que presentan crisis tónicas

y muerte, así como un aumento en la latencia a todos los tipos de crisis y la muerte inducidos por el PTZ. Finalmente, en los animales que sufrieron crisis hipertérmicas 20 días antes del PTZ, la producción de crisis mioclónicas, clónicas, tónica y muerte disminuyó, efectos asociados a una mayor latencia a la aparición de las crisis tónicas. El incremento de las latencias a todas las crisis inducidas por el PTZ, sugiere que no hubo cambios en el tiempo total de crisis en los animales expuestos a crisis hipertérmicas 24 h y 20 días previos.

Los efectos anticonvulsivantes inducidos en animales inmaduros expuestos previamente a crisis hipertérmicas observados en el presente trabajo son similares a los encontrados por otros autores en animales adultos. Al respecto se sabe que la administración subtóxica de convulsivantes, de “kindling”, electrochoques y eventos hipóxicos e isquémico pueden prevenir del daño neuronal y la actividad epiléptica inducidos por el ácido kaínico, pilocarpina y bicuculina (El Bahh y cols., 1997, 2001; Emerson y cols., 1999a, b; Kelly y McIntyre 1994; Penner y cols., 2001; Plamondon y cols., 1999; Pohle y Rauca 1994; Rejdak y cols., 2001; Sasahira y cols. 1995). Así mismo, un episodio corto de crisis inducido por ácido kaínico se asocia a un efecto protector contra el daño neuronal producido por el *status epilepticus* inducido por el

mismo ácido kaínico de manera subsecuente (Najim y cols., 1998). También se sabe que el pretratamiento con ácido kaínico protege a las ratas del desarrollo del “kindling”. Al aumentar el umbral de posdescarga y suprimir la recurrencia de las crisis espontáneas (Bragin y cols., 2002). En el animal inmaduro la producción de una crisis hipertérmica eleva el umbral de hipertermia para producir crisis subsecuentes, un efecto que al parecer está mediado por el neuropéptido Y (Dube y cols., 2005). Sin embargo, llama la atención que la experiencia previa a crisis convulsivas por PTZ en etapas tempranas de la vida facilita el desarrollo de crisis hipertérmicas (McCaughran y Manetto, 1983), lo que sugiere que el efecto protector depende del tipo de factor estresante y crisis convulsiva.

El efecto anticonvulsivante producido por la exposición previa a crisis convulsivas en animales adultos suele durar varios días (Kelly y McIntyre, 1994; Penner y cols., 2001). En el presente estudio encontramos que los animales inmaduros presentan efectos protectores contra las crisis por PTZ hasta 20 días después de haber presentado una crisis por hipertermia. En el futuro será interesante investigar este efecto en periodos más prolongados.

Por otra parte, hallamos que los animales expuestos a hipertermia sin crisis convulsivas también mostraron efectos protectores a las convulsiones inducidas por el PTZ, aunque diferentes de las producidas por las crisis hipertérmicas. En los animales expuestos a hipertermia sin crisis 24 h antes del PTZ, se observa una mayor latencia a presentar crisis mioclónicas, pero reducción de la misma para las crisis clónicas y tónica. De manera similar, los animales expuestos a hipertermia 20 días antes del PTZ presentaron un incremento en la latencia a las crisis mioclónicas y clónicas, pero sin cambio en la aparición de la fase tónica. Este aumento en la latencia en los componentes tempranos y acortamiento o ausencia de cambio en la fase tónica sugiere un acortamiento en el tiempo total de las convulsiones inducidas por el PTZ en animales previamente expuestos al estrés de la hipertermia. Sin embargo, llama la atención que la exposición previa a hipertermia sin crisis no modificó el porcentaje de animales que respondieron al PTZ. Los resultados antes descritos permiten sugerir que la exposición previa a hipertermia sin convulsiones protege a los animales de la producción de crisis subsecuentes de diferente manera que la producida por las crisis hipertérmicas.

La hipertermia por si misma, modifica la excitabilidad neuronal en animales adultos e inmaduros, aunque las evidencias en la literatura son controvertidas ya que se describen efectos inhibitorios y excitatorios. Se describe que en animales adultos la hipertermia moderada y severa incrementa la inhibición en el giro dentado del hipocampo adulto, pero disminuye en CA1 durante la hipertermia severa. Por el contrario, en animales inmaduros, la hipertermia moderada no modifica la excitabilidad neuronal del giro dentado, pero la disminuye en CA1 (Liebregts y cols., 2002). Estos datos apoyan la idea de que la hipertermia incrementa la excitabilidad neuronal en el hipocampo inmaduro y favorece las crisis hipertérmicas. En el cerebro inmaduro se sugiere que la hipertermia induce una disfunción de la homeostasis iónica que genera un aumento en la excitabilidad neuronal (Wu y Fisher, 2000). La hipertermia también produce un incremento de la actividad neuronal en áreas cerebrales como el hipocampo, asociada a un incremento en la expresión de genes tempranos y de la hormona liberadora de la corticotropina, que a su vez aumenta la excitación mediada por el glutamato (Hatalski y cols., 2000). Se describe que la producción de hipotermia durante la inducción de hipoxia-isquemia, hace que el cerebro inmaduro sea

altamente susceptible al daño cerebral, un efecto que parece estar mediado por la activación de la vía apoptótica (Tomimatsu y cols., 2003).

Por el contrario, otras evidencias experimentales sugieren un efecto protector de la hipertermia. En animales adultos, el choque térmico mitiga las consecuencias neuropatológicas de un evento isquémico subsecuente (Chopp y cols., 1989; Kitagawa y cols., 1991; Xu y cols., 2002). El choque térmico preconditionante también protege contra el daño de retina (Barbe y cols., 1988) y contra el daño de médula espinal (Zhang y cols., 2000). Así mismo, la exposición a hipertermia transitoria sin crisis convulsivas en animales adultos se asocia a un menor daño neuronal en hipocampo inducido por ácido kaínico y atenúa la susceptibilidad a las crisis inducidas por bicuculina (Duveau y cols., 2000). En el animal inmaduro, la producción previa de hipertermia protege al cerebro del daño inducido por un proceso de hipoxia-isquemia (Yager y Asselin, 1999).

El presente estudio es la primera evidencia experimental de que el pretratamiento hipertérmico transitorio y las crisis hipertérmicas en animales inmaduros protegen, bajo ciertas condiciones, contra las crisis epilépticas inducidas por el PTZ. Nuestros resultados son

consistentes con muchos de los estímulos estresantes precondicionantes que inducen un sistema de defensa evolutivamente conservado. Las crisis hipertérmicas y la hipertermia pudieran estar evocando una respuesta reactiva, adaptativa y de sobrevivencia, en un intento de proteger a las células contra el calor y otros eventos adversos. En el cerebro inmaduro, la respuesta adaptativa que sigue al estímulo estresante, podría estar previniendo la crisis, como se observa en el presente estudio.

Los efectos protectores de las crisis hipertérmicas deben de diferir de los producidos por la hipertermia, ya que las primeras se asocian a un exceso de excitabilidad neuronal. Mientras, que la hipertermia, para evitar el daño cerebral, no debe exacerbar la excitabilidad neuronal, disparar la epilepsia o inducir pérdida neuronal en alguna área cerebral vulnerable. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que los efectos de las crisis hipertérmicas difieren de los producidos por la hipertermia sola, tanto en la susceptibilidad a crisis por PTZ, como en cambios en los receptores a  $GABA_A$  y BDZ (ver abajo).

Se requieren más estudios con otros modelos experimentales de epilepsia para obtener un panorama más general del efecto protector

del pretratamiento con choque térmico contra la epilepsia en animales inmaduros. Esto podría ser particularmente interesante para conocer si esta protección es efectiva con algún tipo de epilepsia y si tiene un efecto anticonvulsivo, un efecto antiepileptogénico, o ambos.

El papel del GABA como un posible factor que media la protección contra las crisis por PTZ merece ser mencionado en el presente contexto. Al respecto se sabe que los agonistas gabaérgicos protegen de las crisis inducidas por PTZ (Gonsalves y Gallager, 1986), y que un incremento en el contenido tisular del GABA producido por hipoxia cerebral está fuertemente correlacionado con una disminución en la susceptibilidad a las crisis inducidas por bicuculina (Sieklicka y cols., 1992). Es posible que una activación del sistema GABA esté asociada a los efectos anticonvulsivantes inducidos por la hipertermia y las crisis hipertérmicas.

## **8.2 Efecto de las crisis hipertérmicas y la hipertermia en la unión a los receptores GABA<sub>A</sub> y BDZ**

En el presente estudio se investigaron los cambios a diferentes tiempos en la unión del receptor GABA<sub>A</sub> y BDZ inducidos por la

producción de crisis hipertérmicas e hipertermia sola, durante un periodo de 20 min.

Nuestros resultados muestran que la unión al receptor GABA<sub>A</sub> aumentó significativamente en todas las áreas evaluadas a los 30 min después de las crisis hipertérmicas e hipertermia sola, un efecto que se observó a las 24 h y 20 días después de las crisis. En cuanto a la unión al receptor a BDZ, los animales con crisis hipertérmicas mostraron un aumento en áreas cerebrales específicas únicamente a las 24 h después de las crisis hipertérmicas. De igual manera, en los animales expuestos a hipertermia sin crisis, se observó un aumento significativo a los 30 min, efecto que persistió a las 24 h y 20 días.

En relación al aumento que se observó a los 30 min después de la hipertermia sin crisis, pudiera explicarse por los experimentos *in vitro* que indican que el pentobarbital aumenta la unión de la BDZ (Carlson y cols., 1992). Por su parte Suzuki y cols., 1996, reportaron que la unión de las BDZ no se encuentra modificada 24 h después de una administración aguda de pentobarbital. Probablemente los cambios observados a los 30 min después de la hipertermia en la unión de GABA y BDZ, pudiera deberse al efecto del pentobarbital, sin embargo, los cambios a más largo plazo se deben principalmente a la hipertermia. Por lo anterior son necesarios experimentos adicionales en los que se exponga al animal a temperaturas altas que no induzcan crisis y evitar la administración del pentobarbital.

Tanto la producción de crisis hipertérmicas y de hipertermia sola, producen incrementos similares en la unión a los receptores a GABA<sub>A</sub> a los 20 días después de ambas manipulaciones experimentales. Por lo contrario, a este tiempo se observó un aumento de la unión al receptor a BDZ en casi todas las áreas cerebrales evaluadas de los animales expuestos a hipertermia, mientras que en los animales con crisis hipertérmicas dicho efecto se restringió a las cortezas cerebrales. Lo anterior sugiere que los efectos a largo plazo en la unión a los receptores GABA<sub>A</sub> podrían deberse principalmente a la hipertermia más que a las crisis hipertérmicas, mientras que los cambios a largo plazo en la unión de los receptores a BDZ son exclusivos de la hipertermia.

Las neuronas tienen una baja capacidad para responder al choque térmico (Nishimura y cols., 1991), mientras que las células de la microglía son las primeras en reconocer dichas situaciones estresantes (Streit y Kincaid-Colton, 1995). Así mismo, la hipertermia incrementa la expresión de productos de genes tempranos, como la proteína FOS (Dragunow y cols., 1989). Por su parte, Krueger y cols. (1999) reportó que la hipertermia incrementa la expresión de proteínas de choque térmica en células gliales de hipocampo, mientras que la actividad epiléptica inducida por ácido kaínico aumenta la expresión de estas proteínas en neuronas de la misma estructura. Lo anterior nos permite sugerir que la hipertermia es capaz de activar probablemente a las células de la glía. Por otra parte, se sabe que la estimulación de

receptores periféricos a BDZ, que se localizan en células gliales en el SNC, inducen la expresión de proteínas de choque térmico a través de un mecanismo de estrés oxidativo intracelular (Camins y cols., 1995) y que la administración de agonistas inversos a las BDZ revierten la expresión de dichas proteínas así como la atenuación de la actividad motora inducida por estrés (Hayase y cols., 2003). Es posible que los cambios en receptores a BDZ que observamos a los 20 días después de la exposición a la hipertemia sin crisis puedan estar asociados a la activación de proteínas de choque térmico en células gliales donde se encuentren dichos receptores.

Llama la atención que los cambios hallados en la unión a las BDZ 24 h después de las crisis hipertérmicas en ratas de 10 días de edad son similares a los observados a las 72 h después del *status epilepticus* en ratas de 15 días de edad (Rocha y cols., 2000). Aunque las crisis hipertérmicas a los 10 días de edad y las crisis por ácido kaínico a los 15 días de edad son dos modelos diferentes de epilepsia en dos edades distintas, ambos comparten características comunes. Las ratas que sufren crisis hipertérmicas durante un periodo de 20 min a los 10 días de edad no desarrollan crisis espontáneas en el adulto (Dube y cols., 2000) y presentan alteraciones estructurales en el hipocampo y la amígdala que son evidentes a las 2 semanas, pero no 4 semanas después de las crisis (Toth y cols., 1998). En animales de menos de 18 días de edad, el ácido kaínico produce crisis generalizadas que no evolucionan a *status epilepticus* ni inducen daño

neuronal (Nitecka y cols., 1984). De hecho, estos animales presentan una reducción a la susceptibilidad a desarrollar epilepsia, así como un aumento de la inhibición cuando las crisis son inducidas en ratas de 14 días de edad (Linch y cols., 2000). Es posible que en el cerebro en desarrollo una importante activación del sistema GABA después de las crisis inducidas por ambos, hipertermia y ácido kaínico pudiera jugar un papel relevante en las consecuencias a largo plazo de las crisis. También es posible que en el cerebro inmaduro ambos factores estresante, la hipertermia sola y las convulsiones, induzcan a largo plazo cambios similares en el complejo GABA<sub>A</sub>/BDZ.

Con base en varios estudios epidemiológicos que sugieren que las crisis febriles en el cerebro inmaduro inducen el desarrollo de epilepsia del lóbulo temporal en el adulto (Cendes y cols., 1993; Trinka y cols., 2002), en el presente estudio se esperaba que las ratas que experimentaron crisis hipertérmicas a los 10 días de edad desarrollaran cambios en la unión del receptor GABA<sub>A</sub>/BDZ que fueran paralelos a los detectados en modelos experimentales de epilepsia del lóbulo temporal en animales adultos. El “kindling” eléctrico, un modelo comúnmente usado para el estudio de la epileptogénesis y la epilepsia del lóbulo temporal (Goddard y cols., 1969; Racine 1972), se asocia a un aumento de la unión de los receptores GABA<sub>A</sub> y BDZ en el giro dentado de ratas adultas 24 h después de la última crisis tipo “kindled”, efecto que no se detecta 28 días después de la última estimulación (Nobrega y cols., 1989; Shin y cols., 1985). El ácido kaínico, otro modelo experimental que induce cambios patológicos similares a los observados en la epilepsia del lóbulo temporal en humanos (Nadler 1979; Pisa y cols., 1980), produce *status epilepticus* asociado a un decremento y

aumento simultáneo de la unión a BDZ en varias áreas cerebrales a las 24 h después de haber administrado el ácido kaínico, mientras que a los 40 días del mismo se detecta un aumento de receptores a BDZ en el giro dentado (Rocha y Ondarza, 1999). Los datos del presente estudio indican que las modificaciones en la unión del receptor GABA<sub>A</sub>/BDZ producidas por las crisis hipertérmicas en el cerebro de rata inmadura son diferentes a las producidas por el “kindling” y el ácido kaínico en el cerebro adulto y no apoyan la hipótesis de que la producción de crisis hipertérmicas, en la vida temprana causen epilepsia del lóbulo temporal. Sin embargo, es necesario investigar efectos en la unión a los receptores GABA<sub>A</sub>/BDZ a más largo plazo, ya que en el presente trabajo se evaluó hasta la edad juvenil, faltando la edad adulta, la que nos permitiría una mejor comparación con el “kindling” y el ácido kaínico.

La unión del receptor a GABA<sub>A</sub> y BDZ se evaluó en áreas cerebrales específicas involucradas en la actividad epiléptica. Se sabe que la corteza, la amígdala y el hipocampo están implicados en la generación y la propagación de las crisis convulsivas (Baram y cols., 1997; Bear y Lothman, 1993; Veliskova y cols., 1996). La sustancia *nigra* y los núcleos talámicos son estructuras subcorticales relevantes para la generalización de las crisis epilépticas (Cassidy y Gale, 1998; Hayashi, 1952; Jinnai y cols., 1954; Hass y cols., 1990; Moshé y cols., 1995) y en la regulación de la excitabilidad cortical (Janowsky y cols., 1992). La sustancia gris periacueductal se sugiere como una vía para

la generalización caudal-rostral de las crisis (Peterson y cols., 2000). Es posible que el aumento de la unión del receptor GABA<sub>A</sub>/BDZ en estas áreas cerebrales de animales inmaduros se asocie a un aumento de la función del sistema gabaérgico y a la reducción de la susceptibilidad a las crisis inducidas por el PTZ, efectos similares a los observados en ratas adultas en las que se producen un aumento de la unión al receptor a BDZ (Rocha y cols., 1994; 1996).

Por otra parte, la actividad del GABA se ha asociado con situaciones que se caracterizan por un aumento de la excitabilidad neuronal (Staley y cols., 1995). Bajo estas circunstancias, la actividad del GABA puede conducir directamente a una sincronización rítmica de las células piramidales del hipocampo maduro similar a la producida por las crisis epilépticas (Fujiwara-Tsukamoto y cols., 2003). El cerebro inmaduro presenta una alta tendencia para la actividad ictal (Liebregts y cols., 2002; Moshé y cols., 1983, 2000), una situación que se ha asociado con la excitación mediada por el GABA (Dzhala y Stanley, 2003). El aumento de la unión al receptor GABA<sub>A</sub>/BDZ detectada en varias áreas cerebrales 20 días después de las crisis hipertérmicas e hipertermia podría asociarse con la acción excitatoria inducida por el aumento del GABA en esta ventana del desarrollo. Sin embargo, la protección a los efectos del PTZ observados en el presente estudio en los animales inmaduros previamente expuestos a hipertermia o crisis hipertérmicas sugieren un incremento de la neurotransmisión inhibitoria.

Las crisis hipertérmicas en la vida temprana producen un aumento a largo plazo de la actividad sináptica inhibitoria, un efecto que posiblemente dependa de la activación de la PKA (Chen y cols., 1999). Esta activación podría estar asociada con un aumento de la fosforilación de algunas subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>, lo que pudiera reducir la función del receptor (Leidenheimer y cols., 1991). Es posible que el aumento de la unión del receptor GABA<sub>A</sub>/BDZ implique una respuesta rebote de este efecto. Otros mecanismos podrían ser investigados en el futuro.

En el presente estudio se encontró que las crisis hipertérmicas y la hipertermia resultan en cambios significativos en la unión del receptor GABA<sub>A</sub> que no fueron paralelos a los producidos en el sitio de unión a BDZ. Estos efectos diferenciales pueden resultar de cambios en las subunidades que regulan la unión del receptor GABA<sub>A</sub> o BDZ en el cerebro inmaduro. En neuronas de ratas epilépticas adultas, la expresión de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> y su ARNm se altera de manera significativa, efecto que correlaciona con modificaciones importantes en la función del mismo (Brooks-Kayal y cols., 1998; Schwarzer y cols., 1997). Las mutaciones de la subunidad  $\gamma 2$ , que se sugiere como un mecanismo productor de las crisis febriles

(Bowser y cols., 2002; Harkin y cols., 2002; Wallace y cols., 2001), pudiera causar un ensamble incorrecto de las subunidades en el complejo del receptor y de esta manera reducir la sensibilidad a las BDZ, lo cual pudiera inducir un incremento en la excitabilidad neuronal (Wu y cols., 2004). Además, el daño de la subunidad  $\alpha 1$  del receptor GABA<sub>A</sub> altera el ensamble al receptor, así como la respuesta farmacológica y conductual a las BDZ (Kralic y cols., 2002). Esperando que las crisis hipertérmicas e hipertermia induzcan una disminución de la modulación de las BDZ por daño de las subunidades específicas del receptor, es posible que la unión del receptor GABA<sub>A</sub> esté expresada en exceso como un mecanismo compensatorio.

### **8.3 Efecto de las crisis hipertérmicas en los niveles tisulares de aminoácidos**

Encontramos que las crisis hipertérmicas en animales inmaduros conllevan a cambios en el contenido tisular de aminoácidos que no son paralelos a los producidos por la epilepsia del lóbulo temporal de sujetos adultos, tanto en pacientes como en ratas. Dichos cambios dependieron de la estructura evaluada y del tiempo de análisis.

La evaluación del contenido tisular de aminoácidos en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal se ha restringido a estructuras que son resecadas durante la cirugía de epilepsia, tales como la corteza cerebral en la que se detecta un incremento del contenido tisular de glutamato (Perry y Hansen, 1981; Sherwin y cols., 1988). Por lo anterior, resulta interesante la comparación de nuestros resultados con los obtenidos por Lösher y cols. (1993) con ratas adultas, a los 36 días después de la última crisis generalizada inducida por “kindling”. En el presente estudio, observamos que, 20 días después de la última crisis hipertérmica existe un incremento de aspartato, GABA, glutamato y glicina en la corteza cerebral, mientras que en el “kindling”, se produce un decremento de glutamato y aspartato, mientras que el GABA y la glicina no se modifican. En el hipocampo encontramos un incremento de aspartato, glutamato, glutamina y taurina, así como un decremento de GABA, alanina y glicina. Con el “kindling”, el hipocampo presenta decremento de aspartato, GABA, glutamato y taurina, mientras que la glicina aumenta. En la amígdala cerebral detectamos una elevación de alanina, aspartato, GABA y glicina, así como una disminución de glutamato. En animales con “kindling”, la amígdala presenta un incremento de aspartato y glicina, pero el GABA, glutamato y taurina

no se modifican. En el cerebelo observamos un incremento de todos los aminoácidos evaluados, contrariamente que con el “kindling”, donde, esta estructura presenta un decremento del contenido tisular de glutamato, aspartato, GABA y taurina. Esto pudiera reflejar una hiperactividad neuronal, la cual juega un papel inhibitor de las crisis, lo que pudiera explicar el papel que tiene dicha estructura en la supresión de las mismas.

Resulta interesante para el presente estudio la correlación de los niveles tisulares de aminoácidos en áreas cerebrales específicas de animales previamente expuestos a crisis hipertérmicas con su susceptibilidad a las crisis por PTZ. Al respecto, se sabe que las crisis mioclónicas y clónicas inducidas por el PTZ están mediadas por la activación de estructuras del cerebro anterior, como la neocorteza (Ben Ari y cols. 1981; Browning 1985), mientras que la extensión tónica se modula en regiones del diencefalo y el tallo cerebral, incluyendo la formación reticular, el bulbo y la sustancia gris periacueductal (Browning 1985; Miller y cols., 1987). Los animales sacrificados 30 min después de las crisis hipertérmicas mostraron un aumento significativo de casi todos los aminoácidos evaluados, tanto inhibitorios como excitatorios, en todas las estructuras analizadas. Es

probable que dicho incremento de los aminoácidos excitatorios pueda estar mediando la reducción en la latencia a las crisis inducidas por el PTZ, mientras que el incremento de los aminoácidos inhibitorios pudiera estar involucrado en la disminución en el porcentaje de animales que respondieron a dicho convulsivante.

Los animales sacrificados a las 24 h después de las crisis hipertérmicas mostraron un incremento del contenido tisular del glutamato y glutamina en el hipocampo así como de aspartato y glutamato en la amígdala. Así mismo, en tallo cerebral presentaron un incremento de la mayoría de los aminoácidos analizados. Sin embargo, en el resto de las estructuras evaluadas se detectó un decremento del contenido tisular de la mayoría de los aminoácidos. Este decremento puede ser consecuencia de un aumento del consumo de los aminoácidos durante la fase ictal o como consecuencia de un exceso de liberación de los mismos durante la crisis (Ueda y Tsuru, 1995; Ding y cols., 1998). Es posible que el incremento de la latencia a las crisis mioclónicas y clónicas inducidas por el PTZ, 24 h después de las crisis hipertérmicas pueda ser consecuencia del decremento de la actividad neuronal durante el periodo refractario postictal de las crisis hipertérmicas (Caldecott-

Hazard y Engel, 1987), asociada a una disminución de los niveles tisulares de los aminoácidos en estructuras que están involucradas en la expresión de las mismas, como la corteza cerebral (Chagnac-Amitai y cols., 1989; Chervin y cols., 1988). Así mismo, un incremento de aminoácidos inhibitorios (glicina y taurina) en el estriado pudiera estar involucrado en estos efectos. Por otra parte, se sabe que el tallo cerebral juega un papel importante en la producción de la fase tónica inducida por el PTZ al permitir la transmisión de señales del cerebro anterior a la médula espinal (Yonekawa y cols., 1980). El incremento de aminoácidos (GABA, glutamato, glutamina, glicina y taurina) a nivel de tallo cerebral podría estar asociado a la reducción de la incidencia de la fase tónica y la muerte en los animales expuestos 24 h antes a las crisis hipertérmicas. Además, de la participación de otros sistemas como el serotoninérgico que pudiera estar participando en la inhibición de las crisis, por lo que se requieren estudios de este sistema en las crisis inducidas por hipertermia.

Los animales que se sacrificaron a los 20 días después de presentar crisis hipertérmicas, mostraron un aumento del contenido tisular de todos los aminoácidos en el estriado y el cerebelo. Estos datos resultan interesantes, ya que el estriado, al asociarse con la

substancia negra, podría estar modulando la expresión de las crisis convulsivas en ratas inmaduras (MacNamara y cols., 1984). En cuanto al cerebelo, se sabe que su estimulación eléctrica puede reducir las crisis convulsivas (Cooper y cols., 1976; Fisher y cols., 1997). El incremento de los aminoácidos en estriado y cerebelo pudiera reflejar un aumento de la actividad neuronal de estas estructuras, ejercer un efecto protector e inducir un aumento de la latencia a la fase tónica y reducción de la incidencia de los diferentes tipos de crisis inducidas por el PTZ. Llama la atención que en otras estructuras existe incremento del contenido tisular de algunos aminoácidos, tanto inhibitorios como excitatorios, i.e., la corteza cerebral (GABA, glicina, aspartato y glutamato), hipocampo (aspartato, glutamina, glutamato y taurina), tallo cerebral (aspartato y glutamina) y amígdala (aspartato, GABA y glicina). El incremento de aminoácidos inhibitorios pudiera relacionarse con la protección a las crisis por PTZ a los 20 días después de las crisis hipertérmicas. Por el contrario, el incremento de los aminoácidos excitatorios podría asociarse con el aumento de la excitabilidad cerebral a largo plazo varios días después de las crisis hipertérmicas reportada por algunos autores (Bender y cols., 2003; Brewster y cols., 2002).

En el presente estudio se encontró un aumento del contenido tisular de aminoácidos como GABA y el glutamato, a los 20 días después de las crisis hipertérmicas. Este incremento puede explicarse por una alteración en el sistema de captura o de las enzimas responsables de la síntesis de dichos aminoácidos. Se sabe que la actividad epiléptica, tanto en pacientes como en modelos de epilepsia, induce cambios a largo plazo en diferentes transportadores. Existe una disminución del transportador vesicular VGLUT-1 en la corteza epiléptica humana (Alonso-Nanclares y DeFelipe, 2005). La actividad epiléptica produce un decremento del RNAm y de las proteínas del transportador de glutamato y aspartato (GLAST), del transportador del glutamato (GLT-1), y del transportador de aminoácidos excitatorios (EAAC-1). El transportador a GABA, GAT-3, presenta un aumento, mientras que el transportador GAT-1 no presenta cambios a largo plazo (Ueda y cols., 2001). También se observa una disminución en el transporte, de la captura y del transporte inverso, por lo que se presenta un aumento en el tono inhibitorio interictal (Patrylo y cols., 2001).

Con respecto a animales inmaduros, Arias y cols., (1992) describieron que la actividad de la enzima GAD se encuentra

disminuida en animales de 2 y 5 días de edad sometidos a crisis hipertérmicas. Sin embargo, estos autores no encontraron cambios en la actividad de dicha enzima en animales de 10 y 15 días de edad, probablemente debido a que el tiempo de exposición a la hipertermia fue de 10 min, menor al utilizado por el método de Baram. Otro factor importante puede ser la temperatura ambiental, que no excedió 2°C a la temperatura corporal, situación que probablemente no fue suficiente para que la temperatura cerebral aumentara de forma tal que generara crisis hipertérmicas. Al respecto se sabe que es necesario un incremento de la temperatura cerebral para que se induzcan las crisis (Yang y cols., 2002). Además, en el estudio realizado por Arias y cols., (1992), se evaluó la actividad de la GAD en el cerebro completo, lo cual no permite visualizar cambios en áreas cerebrales específicas. Lo anterior nos hace sugerir que son necesarios estudios adicionales en los que se cuantifique la actividad de la GAD en áreas cerebrales específicas en modelos como el descrito por Baram y cols., (1997). La relevancia del estudio de Arias y cols., (1992) consiste en que el decremento de la GAD por la hipertermia produce crisis. Por su parte, Orozco y cols., (2000) reportaron que en ratas inmaduras no se detectan cambios en el transportador GAT-1 a nivel del hipocampo 24

h después de la producción de crisis hipertérmicas. Sin embargo, al momento se desconoce si con este modelo experimental se producen cambios en otro tipo de transportadores o en otras áreas cerebrales, varios días después de las crisis hipertérmicas.

Los niveles elevados de glutamato 20 días después de las crisis hipertérmicas, pudieran modificar la excitabilidad neuronal e inducir alteraciones neurotóxicas. Previamente se demostró que las crisis hipertérmicas recurrentes se asocian a un aumento de la excitabilidad neuronal, y a largo plazo con la producción de epileptogénesis, situación que al parecer depende de la activación de procesos inflamatorios y de la recurrencia de las crisis (Auvin y cols., 2005; Dube y cols., 2005). De hecho, se reporta que un solo evento de crisis hipertérmicas puede aumentar la excitabilidad neuronal (Dube y cols., 2000; Chen y cols., 1999; 2001).

El aumento del glutamato puede inducir daño neuronal e incremento de la excitabilidad nerviosa. Al respecto, se describe que la actividad epiléptica inducida por la 4-aminopiridina, un bloqueador de los canales de potasio, se debe a la acción combinada de la liberación de aminoácidos excitatorios y a la estimulación directa de la actividad neuronal (Peña y Tapia, 1999). Por otra parte, el aumento de la liberación del glutamato inducido por la 4-aminopiridina se asocia a un proceso de muerte neuronal (Peña y Tapia, 2000), el cual se produce cuando la cantidad del aminoácido liberado es alta y por una sobreactivación de sus receptores, pero es independiente de la producción de la actividad epiléptica (Ayala y Tapia, 2005). Así mismo, se reporta que el substrato de la actividad

epiléptica inducida por la 4-aminopiridina es el aumento de la liberación del glutamato asociada a una mayor excitabilidad neuronal inducida por dicho fármaco (Peña cols., 2002).

En el presente estudio encontramos que las crisis hipertérmicas producen un incremento de glutamato a largo plazo, efecto que puede estar asociado a muerte neuronal y crisis espontáneas detectadas después de la producción de crisis hipertérmicas repetidas (Dube y cols., 2005; Orozco y Feria, 2001). Nuestros resultados no nos permiten correlacionar la producción de eventos neurotóxicos y alteraciones de excitabilidad neuronal, aparte de que solo se evaluó el efecto de una sola crisis hipertérmica. En estudios futuros será interesante investigar los efectos de crisis hipertérmicas recurrentes asociadas a lesiones cerebrales en el sistema glutamatérgico, con el propósito de determinar su influencia en la producción de crisis espontáneas. La probabilidad de provocar las crisis epilépticas depende de la madurez del cerebro. Con la maduración aumenta la resistencia a las crisis inducidas por hipertermia, y en individuos jóvenes se requiere un grado bajo de hipertermia para convulsionar (Jiang y cols. 1999; Liebrechts y cols., 2002). Se sabe que el cerebro adulto puede tolerar una temperatura corporal total de 42 °C por una hora sin mostrar signos de muerte celular en el SNC o síntomas neurológicos (Khan y Brown, 2002; Leoni y cols., 2000). En adultos, las crisis febriles no tienen consecuencias dañinas en el hipocampo, así como ningún cambio neuropatológico detectable bajo el status epilepticus. De esta manera, la hipertermia parece ser un estímulo relativamente seguro. La opinión general es que en el cerebro adulto normal la hipertermia como la fiebre puede inducir una condición adaptativa. En el cerebro inmaduro, cuando la hipertermia ocurre

simultáneamente con otros eventos patofisiológicos, tal como el trauma cerebral, inflamación, daño neuropatológico o alteraciones de la migración neuronal, el deterioro cerebral secundario puede ser severo (Germano y cols., 1996).

Estas evidencias experimentales apoyan la hipótesis de que la hipertermia aumenta el daño neuronal cuando es sobrepuesta con diferentes retos neuropatológicos. Sin embargo, es todavía desconocido si los beneficios de la terapia antipiretica prevalece sobre sus riesgos justo cuando la temperatura es elevada (Thompson y cols., 2003).

Los estímulos estresantes crean una resistencia de las neuronas a estímulos subsecuentes del mismo o de diferente tipo, lo que ha dado origen al concepto de “tolerancia cerebral” que se caracteriza por una resistencia transitoria del cerebro a un daño posterior (Rejdak y cols., 2001). Se describe que en la tolerancia cerebral se generan metabolitos y ligandos que pueden participar en dicho fenómeno (Rejdak y cols., 2001; Dirnagl y cols., 2003; Blondeau y cols., 2000). También se asocia a un aumento de la expresión de las proteínas de choque térmico (Tsuchiya y cols., 2003; Akbar y cols., 2003) las que tienen como función actuar como proteínas “chaperonas” al conducir a otras proteínas hacia el interior de organelos, como los lisosomas y el retículo endoplásmico. Dichas proteínas también participan en el

doblamiento de los polipéptidos nacientes durante la translación (Jacob y cols., 1993; Kiang y cols., 1998). En respuesta al estrés, dichas proteínas pueden ejercer un efecto protector al estabilizar a las proteínas desnaturalizadas y remover a las proteínas dañadas (Parsell y cols., 1993). Se sabe que las neuronas tienen una habilidad limitada a responder al choque térmico en comparación a las células gliales (Nishimura y cols., 1991).

Por otra parte, se describe que los neuroesteroides, que se sintetizan del colesterol (Hu y cols., 1987), se incrementan en respuesta a diferentes estímulos como el estrés (Purdy y cols., 1991). Se sabe que los neuroesteroides modulan de manera positiva la función del receptor GABA<sub>A</sub> (Harrison y Simmonds, 1984; Majewska, 1992), aumentando la corriente de cloro en el mismo (Rupprecht y Holsboer, 1999; Barbaccia y col. 2005). Se sugiere que los neuroesteroides reducen la excitabilidad neuronal a través de su acción en la subunidad  $\delta$  del receptor GABA<sub>A</sub> (Stell y cols., 2003). También se ha descrito que el neuroesteroide alopregnanolona, aumenta las corrientes evocadas por el GABA, un efecto que es mayor en los animales adultos y que está asociado a un incremento de la expresión del RNAm y su proteína de la subunidad  $\alpha$ -1, en el giro

dentado (Mtchedlishvili y cols., 2003). También se reporta que los neuroesteroides, al activar el receptor GABA<sub>A</sub>, suprimen las descargas epileptiformes espontáneas producidas in vitro en el hipocampo (Martin-Garcia y Pallares, 2005; Salazar y cols., 2003). La discontinuación de la exposición crónica a neuroesteroides resulta en una sobreexpresión o disminución del RNAm de diferentes subunidades del complejo GABA<sub>A</sub>, lo cual puede estar asociado a cambios en la expresión de sus receptores y en sus respuestas (Mascia y cols., 2002).

Las evidencias antes expuestas nos permiten sugerir que el estrés inducido por la hipertermia y/o crisis hipertérmicas pudiera activar a los neuroesteroides del animal inmaduro. Esto puede estar mediando los efectos anticonvulsivantes en la prueba del PTZ. También es posible sugerir que, la activación de los neuroesteroides pudiera estar mediando los cambios en la unión de los receptores a GABA<sub>A</sub> y BDZ observados en el presente estudio. Futuros estudios deben de llevarse a cabo con el fin de comprobar esta hipótesis.

## **10. Perspectivas**

Las perspectivas que se han generado de este estudio son las siguientes: Realizar estudios en animales adultos previamente expuestos a crisis hipertérmicas durante la infancia, para determinar el nivel de cambio a largo plazo que se da en los receptores GABA<sub>A</sub> y BDZ, así como de la concentración de aminoácidos excitatorios e

inhibitorios. Además, se requiere conocer tanto en el cerebro inmaduro como en el maduro, la participación del sistema glutamatérgico esto es su contenido extracelular, sus receptores ionotrópicos y metabotrópicos, así como sus diferentes transportadores.

Esto resulta interesante, porque se desconoce si la producción de crisis hipertérmicas en el cerebro inmaduro, utilizando el modelo descrito por Baram se asocia a cambios en otro tipo de transportadores o en otras áreas cerebrales independientes del hipocampo. De esto se desprende que se requiere también evaluar la expresión de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> y de los receptores a glutamato. También se requieren estudios adicionales en los que se cuantifique la actividad de la GAD en áreas cerebrales específicas en modelos como el descrito por Baram y col., (1997).

El aumento del contenido tisular de aminoácidos pudiera asociarse a un aumento de la liberación de los mismos. Por lo anterior es indispensable conocer la liberación *in vivo* de diferentes neurotransmisores, tanto en edades inmaduras como adultas de animales con crisis hipertérmicas.

En el aspecto clínico es importante conocer la implicación de los neuroesteroides en las crisis inducidas por hipertermia y su posible aplicación médica en la epilepsia.

Poco se sabe del daño neuronal que inducen las crisis febriles en el humano y el producido en animales de experimentación, por lo que se requiere evaluar la muerte neuronal por apoptosis y necrosis en animales sujetos a crisis hipertérmicas.

En cuanto al efecto protector que encontramos en animales con crisis hipertérmicas e hipertermia se requieren más estudios para poder conocer el efecto preconditionante de la hipertermia y lograr una aplicación clínica.

## 11. Bibliografia

Akbar MT, Lundberg AMC, Liu K, Vidyadaran S, Wells KE, Dolatshad H, Wynn S, Wells DJ, Latchman DS, Bellerocche J. The neuroprotective effects of heat shock protein 27 overexpression in transgenic animals against kainate-induced seizures and hippocampal cell death. *J Biol Chem.* 2003; 278(22): 19956-19965.

Alonso-Nanclares L, DeFelipe J. Vesicular glutamate transporter 1 immunostaining in the normal and epileptic human cerebral cortex. *Neurosci.* 2005; 134: 59-68.

Arias C, Valero H, Tapia R. Inhibition of brain glutamate decarboxylase activity is related to febrile seizures in rat pups. *J Neurochem.* 1992; 58(1): 369-373.

Augustine GJ. Neurotransmitter receptor and their effects. En *Neuroscience*. Edit. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, Lamantia AS, McNamara JO, Williams SM. Sinauer Associates, Inc. Publishers, sunder Land, Massachusetts. 2001; 141-163

Auvin S, Porta N, Nehlig A, Bourgois B, Bordet R, Valle L. Inflammation in rats pups given febrile seizures enhances long term excitability. *Epilepsia.* 2005; 46(Suppl. 8): 297 (Resumen).

Ayala XG, Tapia R. Late N-methyl-D- aspartate receptor blockade rescues hippocampal neurons from excitotoxic stress and death after 4-aminopyridine-induced epilepsy. *Europ J Neurosci.* 2005; 22: 3067-3076.

Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Crandall PH. Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. *J Neurosci.* 1989; 9(7): 2562-2574.

Baram TZ, Gerth A, Schultz L. Febrile seizures: an appropriate-aged model suitable for long-term studies. *Dev Brain Res.* 1997; 98: 265-270.

Barbaccia ML, Carai MAM, Colombo G, Lobina C, Purdy HR, Gessa LG. Endogenous  $\gamma$ -hydroxybutyric acid (GHB): A study in GHB-S (sensitive) and GHB-R (resistant) rat lines. *Neuropharmacol.* 2005; 49: 48-58.

Barbe MF, Tytell M, Gower DJ, Welch WJ. Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. *Science*. 1988; 241: 1817-1820.

Barr WB, Ashtari M, Schaul N. Bilateral reductions in hippocampal volume in adults with epilepsy and a history of febrile seizures. *J Neurol Neurosurg Psych*. 1997; 63: 461-467.

Bear J, Lothman EW. An in vitro study of focal epileptogenesis in combined hippocampal-parahippocampal slices. *Epilepsy Res*. 1993; 14(3):183-193.

Behr J, Heinemann U, Mody I. Glutamate receptor activation in the kindled dentate gyrus. *Epilepsia*. 2000; 41(Suppl. 6): S100-S103.

Ben-Ari Y, Tremblay E, Riche D, Ghilini G, Naquet R. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neurosci*. 1981; 6(7): 1361-1391.

Bender RA, Dubé C, González-Vega R, Mina EW, Baram TZ. Mossy fiber plasticity and enhanced hippocampal excitability, without hippocampal cell loss or altered neurogenesis, in an animal model of prolonged febrile seizures. *Hippocampus*. 2003; 13: 399-412.

Berkovic SF, Izzillo P, McMahon JM, Harkin LA, McIntosh AM, Phillips HA, Briellmann RS, Wallace RH, Mazarib A, Neufeld MY, Korcsyn AD, Scheffer LE, Mulley JC. LGI1 mutations in temporal lobe epilepsies. *Neurology*. 2004; 62: 1115-1119.

Bernasconi A, Bernasconi N, Caramanos Z, Reutens DC, Antel SB, Andermann F, Dubeau F, Tampieri D, Pike BG, Arnold DL. T2 relaxometry Can lateralize mesial temporal lobe epilepsy in patients with normal MRI. *NeuroImage*. 2000; 12: 739-746.

Bernasconi N, Bernasconi A, Andermann F, Dubeau F, Feindel W, Reutens DC. Entorhinal cortex in temporal lobe epilepsy. A quantitative MRI study. *Neurology*. 1999; 52: 1870-1876.

Bernasconi N, Bernasconi A, Caramanos Z, Antel SB, Andermann F, Arnold DL. Mesial temporal damage in temporal lobe epilepsy: a volumetric

MRI study of the hippocampus, amygdala and parahippocampal region. *Brain*. 2003; 126: 462-469.

Bernasconi N, Natsume J, Bernasconi A. Progression in temporal lobe epilepsy. Differential atrophy in mesial temporal structures. 2005; 65: 223-228.

Biraben A, Bernard A, Seigneret E, Scarabin JM. Influence of the critical EEG pattern on blood flow variations measured by single photon computed emission tomography. *Epileptic Disord*. 2001; (Special Issue): 37-43.

Blondeau N, Plamondon H, Richelme C, Heurteaux C, Lazdunski M. Pre-exposure to subtoxic levels prevents kainic acid lesions in organotypic hippocampal slice cultures: effects of kainic acid on parvalbumin-immunoreactive neurons and expression of heat shock protein 72 following the induction of tolerance. *Eur J Neurosci*. 2000; 8: 1209-1219.

Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, le Bourdelles B, Heavens RP, Smith DW, Hewson L, Rigby MR, Sirinathsinghji DJ, Brown N, Wafford KA, Whiting PJ. Theta, a novel gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit. *Proc Natl Acad Sci*. 1999; 96(17): 9891-9896.

Bower SPC, Kilpatrick CJ, Vogrin JS, Morris K, Cook MJ. Degree of hippocampal atrophy is not related to a history of febrile seizures in patients with proved hippocampal sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psych*. 2000; 69: 733-738.

Bowser DN, Wagner DA, Czajkowski C, Cromer BA, Parker MW, Wallace RH, Harkin LA, Mulley JC, Marini C, Berkovic SF, Williams DA, Jones MV, Petrou S. Altered kinetics and benzodiazepine sensitivity of a GABAA receptor subunit mutation [gamma 2(R43Q)] found in human epilepsy. *Proc Natl Acad Sci*. 2002; 99(23): 15170-15175.

Bradford, H. F. Glutamate, GABA and epilepsy. *Progress Neurobiol*. 1995; 47: 477-511.

Bragin A, Wilson CL, Engel J JR. Increased afterdischarge threshold during kindling in epileptic rats. *Exp Brain Res*. 2002; 144: 30-37.

Brandt C, Ebert U, Löscher W. Epilepsy induced by extended amygdala-kindling in rats: lack of clear association between development of spontaneous seizures and neuronal damage. *Epilepsy Res.* 2004; 62(2-3): 135-156.

Brewster A, Bender RA, Chen Y, Dube C, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ. Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform- and cell specific manner. *J Neurosci.* 2002; 22(11): 4591-4599.

Brewster AL, Bernard JA, Gall CM, Baram TZ. Formation of heteromeric hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the hippocampus is regulated by developmental seizures. *Neurobiol Dis.* 2005; 19: 200-207.

Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin H, Rikhter TY, Kelly ME, Coulter DA.  $\gamma$ -Aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor subunit expression predicts functional changes in hippocampal dentate granule cells during postnatal development. *J Neurochem.* 2001; 77: 1266-1278.

Browning RA. Role of the brain-stem reticular formation in tonic-clonic seizures: lesion and pharmacological studies. *Fed Proc Natl Acad.* 1985; 44: 2425-2431.

Bruhn T, Christensen T, Diemer NH. Evidence for increased cellular uptake of glutamate and aspartate in the rat hippocampus during kainic acid seizures. A microdialysis study using the "indicator diffusion " method. *Epilepsy Res.* 1997; 26: 363-371.

Brunson LK, Eghbal-Ahmadi M, Bender R, Chen Y, Baram TZ. Long-term progressive hippocampal cell loss and dysfunction induced by early-life administration of corticotropin-releasing hormone reproduce the effects of early-life stress. *Proc Natl Aca Sci.* 2001; 98(15): 8856-8861.

Burdette DE, Sakurai SY, Henry TR, Ross DA, Pennell PB, Frey KA, Sackellares JC, Albin RL. Temporal Lobe central benzodiazepine binding in unilateral mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology.* 1995; 45: 934-941.

Cahan LD, Gedes JW, Choi BH, Cotman C. Excitotoxic amino acid receptors in human complex partial epilepsy. *Stereotac Funct neurosurg.* 1990; 54(55): 21-24.

Caldecott-Hazard S. Interictal changes in behavior and cerebral metabolism in the rat: Opioid involvement. *Exp Neurol.* 1988; 99: 73-83.

Caldecott-Hazard S, Engel J. Limbic postictal events: Anatomical substrates and opioid receptor involvement. *Prog Neuro Psychopharmacol.* 1987; 11: 389-418.

Camins A, Diez-Fernandez C, Camarasa J, Escubedo E. Cell surface expression of heat shock proteins in dog neutrophils induced by mitochondrial benzodiazepine receptor ligands. *Immunopharmacol.* 1995; 29(2): 159-166.

Capek R. Multiple targets of anti-epileptic drugs at GABAergic synapses. *Molecular and cellular targets for anti-epileptic drugs.* (Eds. Avanzini G, Regesta G, Tanganelli O, Avoli M. Ed. John Libbey & Company LTD). 1997; 163-182.

Carlson BX, Mans AM, Hawkins RA, Baghdoyan HA. Pentobarbital-enhanced [<sup>3</sup>H]flunitracepam binding throughout the rat brain: an autoradiographic study. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992; 263(3): 1401-1414.

Cassidy RM, Gale K. Mediodorsal thalamus plays a critical role in the development of limbic motor seizures. *J Neurosci.* 1998; 18(21): 9002-9009.

Cavalheiro EA, Fernandes MJ, Turski L, Mazzacoratti MG. Neurochemical changes in the hippocampus of rats with spontaneous recurrent seizures. *Epilepsy Res.* 1992; 9: 239-247.

Cendes F, Andermann F, Dubeau F, Gloor P, Evans A, Jones-Gotman M, Olivier A, Andermann E, Robitaille Y, Lopes-Cendes I, Peters T, Melanson D. Early childhood prolonged febrile convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures and temporal lobe epilepsy: an MRI volumetric study. *Neurology.* 1993; 43: 1083-1087.

Chagnac-Amitai Y, Connors BW. Horizontal spread of synchronized activity in neocortex and its control by GABA-mediated inhibition. *J Neurophysiol.* 1989; 61: 747-758.

Chen K, Aradi I, Thon N, Eghabal-Ahmadi M, Baram TZ, Soltesz I. Persistently modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability. *Nature Med.* 2001; 7(3):331-337.

Chen K, Baram TZ, Soltesz I. Febrile seizures in the developing brain result in persistent modification of neuronal excitability in limbic circuits. *Nature Med.* 1999; 5(8):888-894.

Chervin RD, Pierce PA, Connors BW. Periodicity and directionality in the propagation of epileptiform discharges across neocortex. *J Neurophysiol.* 1988; 60: 1695-1713.

Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol.* 1992; 23(9): 1261-1276.

Chopp M, Chen H, Ho K,L Dereski MO, Brown E, hetzel FW, Welch KM. Transient hyperthermia protects against subsequent forebrain ischemic cell damage inthe rat. *Neurology.* 1989; 39: 1396-1398.

Collingridge GL, Lester RAJ. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev.* 1989; 40(2): 143-210.

Commission on classification and terminology of the International League against epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*1989; 30(4): 389-399.

Consensus Development Panel. Febrile seizures: long-term management of children with fever-associated seizures. *Pediatrics.* 1980; 66: 1009-1012.

Cooper SI, Amin I, Riklan M, Waltz MJ, Poon PU. Chronic cerebellar stimulation in epilepsy. *Arch Neurol.* 1976; 33: 559-570.

DeLorey TM, Handforth A, Anagnostaras SG, Homanics GE, Minassian BA, Asatourian A, Fanselow MS, Delgado-Escueta A, Ellison GD, Olsen RW. Mice lacking the  $\beta 3$  subunit of the GABAA receptor have the epilepsy

phenotype and many of the behavioral characteristics of Angelman syndrome. *J Neurosci*. 1998; 18(20): 8505-8514.

Dichter AM. Epilepsias y trastornos convulsivos. Principios de medicina interna. (En Interamericana McGraw-Hill) 1994; 2558-2570.

Ding R, Asada H, Obata K. Changes in extracellular glutamate and GABA levels in the hippocampal CA3 and CA1 areas and the induction of glutamic acid decarboxylase-67 in dentate granule cells of rats treated with kainic acid. *Brain Res*. 1998; 800: 105-113.

Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci*. 2003; 26(5): 248-254.

Doherty J, Gale K, Eagles DA. Evoked epileptiform discharges in the rat anterior piriform cortex: generation and local propagation. *Brain Res*. 2000; 861: 77-88.

Dragunow M, Currie RW, Robertson HA, Faull RL. Heat shock induces c-fos protein-like immunoreactivity in glial cells in adult rat brain. *Exp Neurol*. 1989; 106: 105-109.

Du F, Eid T, Lothman EW, Köhler C, Schwarcs R. Preferential neuronal loss in layer III of the medial entorhinal cortex in rat models of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 1995; 15: 6301-6313.

Dube C, Brunson KL, Eghbal-Ahmadi M, González-Vega R, Baram TZ. Endogenous neuropeptide Y prevents recurrence of experimental febrile seizures by increasing seizure threshold. *J Mol Neurosci*. 2005; 25(3): 275-284.

Dube C, Chen K, Eghbal-Ahmadi M, Brunson K, Soltesz I, Baram TZ. Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long term. *Ann Neurol*. 2000; 47: 336-344.

Dube C, Richichi C, Chung G, Kapadia B, Baram TZ. Is epileptogenesis after experimental febrile seizures a function of seizure duration and/or recurrence?. *Epilepsia*. 2005; 46(Suppl. 8): 99 (Resumen).

Dubeau V, Arthaud S, Serre H, Rougier A, Le Gal La Salle G. Transient hyperthermia protects against subsequent seizures and epilepsy-induced cell damage in the rat. *Neurobiol Dis.* 2005; 19: 142-149.

During JM, Ryder KM, Spencer DD. Hippocampal GABA transporter function in temporal lobe epilepsy. *Nature.* 1995; 376: 174-177.

During MJ, Spencer DD. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet.* 1993; 341: 1607-1610.

Dzhala VI, Staley KJ. Excitatory actions of endogenously released GABA contribute to initiation of ictal epileptiform activity in the developing hippocampus. *J Neurosci.* 2003; 23(5): 1840-1846.

El Bahh B, Auvergne R, Leré C, Brana C, Le Gal La salle G, Rougier A. Decreased epileptic susceptibility correlates with neuropeptide Y overexpression in a model of tolerance to excitotoxicity. *Brain Res.* 2001; 894: 209-217.

El Bahh B, Lurton D, Sundstrom LE, Rougier A. Induction of tolerance and mossy fibre neuropeptide Y expression in the contralateral hippocampus following a unilateral intrahippocampal KA injection in the rat. *Neuroscience.* 1997; 227: 135-139.

Emerson M, Nelson S, Samson F, Pazdemik T. Aglobal hypoxia preconditioning model: neuroprotection against seizure-induced specific gravity changes (edema) and brain damage in rats. *Brain Res Protoc.* 1999a; 4: 360-366.

Emerson MR, Nelson SR, Samson FE, Pazdemik TL. Hypoxia preconditioning attenuates brain edema associated with kainic acid-induced status epilepticus in rats. *Brain Res.* 1999b (825): 189-193.

Engel J Jr. Inhibitory mechanisms of epileptic seizure generation. En: *Negative motor phenomema*: Ed. Fahn S, Hallet M, Lüders O, Marsden CD, Adv Neurology. Lippincott-Raven Publishers. 1995; 67: 157-171.

Engel J Jr. Introduction to temporal lobe epilepsy. 1996; 26: 141-150.

Engel J Jr. Terminology and classifications. *Seizures and epilepsy*. (En Engel J. Philadelphia: FA Davis Company) 1989; 3-21.

Engel J, Pedley AT. Introduction: What is epilepsy?. A comprehensive textbook. (En: Engel J, Pedley AT, Philadelphia: Lippincott-Raven) 1997; 1-7.

Engel J, Rocha LL. Interictal behavioral disturbances: Search for molecular substrates. *Mol Neurobiol Epilepsy*. En: *Epilepsy Res*. 1992; Suppl 9: 341-350.

Engel J, Williamson DP, Wieser HG. Mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy: A comprehensive textbook*. (En Engel J, Pedley AT, Philadelphia: Lippincott-Raven) 1997; 2471-2426.

Esclapez M, Hirshi JC, Khazipov R, Ben-Ari Y, Bernard C. Operative GABAergic inhibition in hippocampal CA1 pyramidal neurons in experimental epilepsy. *Proc Natl Acad Sci*. 1997; 94: 12151-12156.

Falconer MA. Mesial temporal (Ammon's Horn) sclerosis as a common cause of epilepsy. *Lancet*. 1974; 767-770.

Falconer MA, Serafetinides EA, Corsellis JAN. Etiology and pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol*. 1964; 10: 233-248.

Fisher RS, Mirski M, Krauss GL. Brain stimulation. *Epilepsy: A comprehensive textbook*. (En Engel J, Pedley AT, Philadelphia: Lippincott-Raven) 1997; 1867-1875.

Fogarasi A, Jokeit H, Faveret E, Janszky J, Tuxhorn I. The effect of age on seizure semiology in childhood temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2002; 43(6): 638-643.

Fujiwara-Tsukamoto Y, Isomura I, Nambu A, Takada M. Excitatory GABA input directly drives seizure-like rhythmic synchronization in mature hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience*. 2003; 119: 265-275.

Fukuda M, Morimoto T, Nagao H, Kida K. The effect of GABAergic system activity on hyperthermia-induced seizures in rats. *Dev Brain Res*. 1997; 104: 197-199.

Geddes JW, Cahan LD, Cooper SM, Kim RC, Choi BH, Cotman CW. Altered distribution of excitatory amino acid receptors in temporal lobe epilepsy. *Expl Neurol.* 1990; 108: 214-220.

Germano IM, Zhang YF, Sperber EF, Moshe SL. Neuronal migration disorders increase susceptibility to hyperthermia-induced seizures in developing rats. *Epilepsia.* 1996; 37(9): 902-911.

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

Gonsalves SF, Gallager DW. Tolerance to anti-pentylentetrazol effects following chronic diazepam. *Eur J Pharmacol.* 1986; 121(2): 281-284.

Gu W, Gibert Y, Wirth T, Elisher A, Bloch W, Meyer A, Steinlen KO, Begemann G. Using gene-history and expression analyses to assess the involvement of LGI genes in human disorders. *Mol Biol Evol.* 2005; 22(11): 2209-2216.

Haas KZ, Sperber EF, Moshe SL. Kindling in developing animals: expression of severe seizures and enhanced development of bilateral foci. *Brain Res Dev.* 1990; 56(2): 275-280.

Harkin LA, Bowser DN, Dibbens LM, Singh R, Phillips F, Wallace RH, Richards MC, Williams DA, Mulley JC, Berkovic SF, Scheffer IE, Petrou S. Truncation of the GABA<sub>A</sub>-receptor  $\gamma 2$  subunit in a family with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet.* 2002; 70: 530-536.

Harrison NL, Smmonds MA. Modulation of the GABA receptor complex by a steroids anaesthetic. *Brain Res.* 1984; 323(2): 287-292.

Harvey AS, Grattan-Smith JD, Desmond PM, Chow CW, Berkovic SF. Febrile seizures and hippocampal sclerosis: Frequent and related findings in intractable temporal lobe epilepsy of childhood. *Pediatr Neurol.* 1995; 12: 201-206.

Hatalski CG, Brunson KL, Tantayanubutr B, Chen Y, Baram TZ. Neuronal activity and stress differentially regulate hippocampal and hypothalamic

corticotropin-releasing hormone expression in the immature rat. *Neuroscience*. 2000; 101(3): 571-580.

Hayase T, Yamamoto Y, Yamamoto K, Muso E, Shiota K, Hayashi T. Similar effects of cocaine and immobilization stress on the levels of heat-shock proteins and stress-activated protein kinases in the rat hippocampus, and on swimming behaviors: the contribution of dopamine and benzodiazepine receptors. *Behav Pharmacol*. 2003; 14(7): 551-562.

Hayashi T. Aphysiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jpn J Physiol*. 1952; 3(1): 46-64.

Hjeresen DL, Diaz J. Experimental febrile seizures in rats. *Dev Psychobiol*. 1988; 21(3): 261-275.

Holmes, GL. Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic. *Epilepsia*. 1997; 38(1):12-30.

Holtzman D, Obana K, Olson J. Hyperthermia-induced seizures in the rat pup: a model for febrile convulsions in children. *Science*. 1981; 213: 1034-1036.

Hu YZ, Bourreau E, Jung-Testas I, Robel P, Baulieu EE. Neurosteroids: Oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc Natl Acad Sci*. 1987; 84: 8215-8219.

Huang LT, Yang SN, Liou CW, Hung PL, Lai MC, Wang CL, Wang TJ. Pentylenetetrazol-induced recurrent seizures in rat pups: time course on spatial learning and long-term effects. *Epilepsia*. 2002; 43(6): 567-573.

Insausti R, Amaral DG, Cowan WM. The entorhinal cortex of the monkey. II. Cortical afferents. *J Comp Neurol*. 1987; 264: 356-395.

Jacob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem*. 1993; 268: 1517-1520.

Jallon P. The problem of intractability: the continuing need for new medical therapies in epilepsy. *Epilepsia*. 1997; 38(Suppl. 9): S37-S42.

Janowsky A, Neve KA, Kinzie JM, Taylor B, de Paulis T, Belknap JK. Extrastriatal dopamine D2 receptors: distribution, pharmacological characterization and region-specific regulation by clozapine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992; 261(3): 1282-1290.

Jiang W, Duong TM, de Lanerolle NC. The neuropathology of hyperthermic seizures in the rat. *Epilepsia.* 1999; 40: 5-9.

Jinnai D, Mogami H, Mukawa J, Iwata Y, Kobayashi K. Effect of brain-stem lesions on metrazol-induced seizures in cats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1969; 27(4): 404-411.

Juul-Jensen P. epidemiology of intractable epilepsy. Intractable epilepsy experimental and clinical aspects (En Schmidt D, Morselli PL, New York: Raven Press). 1986: 5-11.

Kandel ER, Siegelbaum SA. Aspectos generales de la transmisión sináptica. En *Principios de Neurociencias*. Ed Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. 2001; 910-935.

Kelly ME, McIntyre DC. Hippocampal kindling protects several structures from the neuronal damage resulting from kainic acid-induced status epilepticus. *Brain Res.* 1994; 634: 245-256.

Kendrick KM, Keverne EB, Chapman C, Baldwin BA. Microdialysis measurement of oxytocin, aspartate,  $\gamma$ -aminobutyric acid and glutamate release from the olfactory bulb of the sheep during vaginocervical stimulation. *Brain Res.* 1988; 442: 171-174.

Khan VR, Brown IR. The effect of hyperthermia on the induction of cell death in brain, testis, and thymus of the adult and developing rat. *Cell Stress Chaperones.* 2002; 7(1): 73-90.

Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 Kda: molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacol Ther.* 1998; 80: 183-201.

Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Kuwabara K, Hata R, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Kamada T. Hyperthermia-induced neuronal protection against ischemic injury in gerbils. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991; 11: 449-452.

Knudsen, FU. Febrile seizures-treatment and outcome. *Brain Dev.* 1996; 18:438-449.

Koepp MJ, Labbé C, Richardson MP, Brooks DJ, Van Paesschen W, Cunningham VJ. Regional hippocampal [<sup>11</sup>C]flumazenil PET in temporal lobe epilepsy with unilateral and hippocampal sclerosis. *Brain.* 1997; 120: 1865-1876.

Kralic JE, O'Buckley TK, Khisti RT, Hodge CW, Homanics GE, Morrow AL. GABA<sub>A</sub> receptor alpha-1 subunit deletion alters receptor subtype assembly, pharmacological and behavioral responses to benzodiazepines and zolpidem. *Neuropharmacol.* 2002; 43(4): 685-694.

Krueger RMA, Armstrong NJ, Plumier CJ, Robertson AH, Currie WR. Cell specific expression of Hsp 70 in neurons and glia of the rat hippocampus after hyperthermia and kainic acid-induced seizure activity. *Mol Brain Res.* 1999; 71: 265-278.

Leidenheimer NJ, Machu TK, Endo S, Olsen RW, Harris RA, Browning MD. Cyclic AMP-dependent protein kinase decreases gamma-aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor-mediated <sup>36</sup>Cl-uptake by brain microsacs. *J Neurochem.* 1991; 57; (2): 722-725.

Leoni S, Brambilla D, Risuleo G, de Feo G, Scarsella G. Effect of different whole body hyperthermic sessions on the heat shock response in mice liver and brain. *Mol Cell Biochem.* 2000; 204(1-2): 41-47.

Liebregts MT, McLachlan RS, Leung LS. Hyperthermia induces age-dependent changes in rat hippocampal excitability. *Ann Neurol.* 2002; 52: 318-326.

Liu Z, Stafstrom CE, Sarkisian M, Tandon P, Yang Y, Hori A, Holmes GL. Age-dependent effects of glutamate toxicity in the hippocampus. *Brain Res Dev.* 1996; 97(2): 178-18.

Löscher W, Horstermann D, Honack D, Rundfeldt C, Wahnschaffe U. Transmitter amino acid levels in rat brain regions after amygdala-kindling or chronic electrode implantation without kindling: evidence for a pro-kindling

effect of prolonged electrode implantation. *Neurochem Res.* 1993; 18(7): 775-781.

Lowry OH, Rosenbrough J, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the follin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.

Lupica CR, Bell JA, Hoffman AF, Watson PL. contribution of the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) to membrane potential and GABA release in hippocampal interneurons. *J Neurophysiol.* 2001; 86: 261-268.

Lynch M, Sayin U, Bownds J, Janumpalli S, Sutula T. Long-term consequences of early postnatal seizures on hippocampal learning and plasticity. *Eur J Neurosci.* 2000; 12: 2252-2264.

Majewska MD. Neurosteroids: endogenous binodal modulators of the GABAA receptor. mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol.* 1992; 38(4): 379-395.

Martin-García E, Pallares M. The intrahippocampal administration of the neurosteroid allopregnanolone blocks the audiogenic seizures induced by nicotine. *Brain Res.* 2005; 1062: 144-150.

Mascia MP, Biggio F, Mancuso L, Cabras S, Cocco LP, Gorini G, Manca A, Marra C, Purdy RH, Follesa P, Bigio G. Changes in GABA<sub>A</sub> receptor gene expression induced by withdrawal of, but not by long term exposure to, ganaxolone in cultured rat cerebellar granule cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 303(3): 1014-1020.

Mathern GW, Babb TL, Pretorius JK, Leite JP. Reactive synaptogenesis and neuron densities for neuropeptide Y, somatostatin and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human fascia dentate. *J Neurosci.* 1995; 15(5 Pt 2): 3990-4004.

Mathern GW, Cifuentes F, Leite JP, Pretorius JK, Babb TL. Hippocampal EEG excitability and chronic spontaneous seizures are associated with aberrant synaptic reorganization in the rat intrahippocampal kainate model. *Electroencephal Clin Neurophysiol.* 1993; 87; 326-339.

Mathern GW, Pretorius JK, Kornblum HI, Mendoza D, Lozada A, Leite JP, Chimelli LMC, Fried I, Sakamoto AC, Assirati JA, Lévesque MF, Adelson

PD, Peacock WJ. Human hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. *Brain*. 1997; 120: 1937-1959.

McCaughran JA Jr, Manetto C. Potentiation of hyperthermia-induced convulsions in the developing rat by previous treatment with pentylenetetrazol. *Exp Neurol*. 1983; 79(1): 287-292.

McDonald JW, Garofalo EA, Hood T, Sackellares JC, Gilman S, McKeever PE, Troncoso JC, Johnston MV. Altered excitatory and inhibitory amino acid receptor binding in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*. 1991; 29(5): 529-541.

McNamara JO. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci*. 1994; 14(6): 3413-3425.

McNamara JO. Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature*. 1999; 379 (Suppl): A15-A22.

McNamara JO. Kindling model of epilepsy. *Adv Neurol*. 1986; 44: 303-318.

Meldrum BS. Excitatory amino acid receptors and their role in epilepsy and cerebral ischemia. *Ann NY Acad Sci*. 1995; 10(757): 492-505.

Mercier G, Lucotte G. Apolipoprotein E epsilon 4 allele, the major risk factor for Alzheimer's disease, is also involved in temporal lobe epilepsy. *Alzheimers Reports*. 2000; 3(5-6): 265-266.

Miller JW, McKeon AC, Ferrendelli JA. Functional anatomy of pentylenetetrazol and electroshock seizures in the rat brainstem. *Ann Neurol*. 1987; 22(5): 615-621.

Minamoto Y, Itano T, Tokuda M, Matsui H, Janjua NA, Hosokawa K, Okada Y, Murakami TH, Negi T, Hatase O. In vivo microdialysis of amino acid neurotransmitters in the hippocampus in amygdaloid kindled rat. 1992; 573(2): 345-348.

Mitchellshvili Z, Zun CS, Harrison MB, Kapur J. Increased neurosteroid sensitivity of hippocampal GABA<sub>A</sub> receptors during postnatal development. *Neurosci*. 2003; 118: 655-666.

Morimoto T, Nagao H, Sano N, Takahashi M, Matsuda H. Electroencephalographic study of rat hyperthermic seizures. *Epilepsia*. 1991; 32(3): 289-293.

Morimoto T, Nagao H, Yoshimatsu M, Yoshida K, Matsuda H. Pathogenic role of glutamate in hyperthermia-induced seizures. *Epilepsia*. 1993; 34(3): 447-452.

Moshé, S. L. Seizures early in life. *Neurology*. 2000; 55(Suppl 1):S15-S20.

Moshé SL, Albala BJ, Ackermann RF, Engel J Jr. Increased seizure susceptibility of the immature brain. *Dev Brain Res*. 1983; 7:81-85.

Moshé SL, Garant DS, Sperber EF, Veliskova J, Kubova H, Brown LL. Ontogeny and topography of seizure regulation by the substantia nigra. *Brain Devel*. 1995; 17(Suppl): 61-72.

Nadler, J. V. Kainic acid: Neurophysiological and neurotoxic actions. *Life Sci*. 1979; 24:(4): 289-300.

Nadler JV, Perry BW, Cotman CW. Selective reinnervation of hippocampal area CA1 and the fascia dentate after destruction of CA3-CA4 afferents with kainic acid. *Brain Res*. 1980; 182: 1-9.

Najim IM, Hadam J, Ckakraverty D, Mikuni N, Penrod C, Sopa C, Markarian G, Luders HO, Babb T, Baudry M. A short episode of seizure activity protects from status epilepticus-induced neuronal damage in rat brain. *Brain Res*. 1998; 810: 72-75.

Nelson KB, Ellenberg JH. Predictors of epilepsy in children who have experienced febrile seizures. *N Engl J Med*. 1976; 295:1029-1033.

Nicoletti F, Perciavalle V, Berretta S, Speciale C, Polizzi MC, Patti F, De Simone D, Sortino MA, Di Giorgio RM, Scapagnini U. Altered time course of changes in the hippocampal concentration of excitatory and inhibitory amino acids during kainate-induced epilepsy. *Eur J Pharmacol*. 1984; 103: 133-137.

Nishimura RN, Dwyer BE, Clegg K, Cole R, de Villis J. Comparison of the heat shock response in cultured cortical neurons and astrocytes. *Brain Res Mol.* 1991; 9: (1-2): 39-45.

Nitecka L, Tremblay E, Charton G, Bouillot JP. Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. II. histopathological sequelae. *Neurosci.* 1984; 13(4): 1073-1094.

Nobrega JN, Kish SJ, Burnham WM. Autoradiographic analysis of benzodiazepine binding in entorhinal-kindled rat brains. *Brain Res.* 1989; 498:315-322.

Olsen RW, Avoli M. GABA and epileptogenesis. *Epilepsia.* 1997; 38, (4): 399-407.

Olsen RW, McCabe RT, Wamsley JK. GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: autoradiographic comparison of GABA, benzodiazepine, and convulsant binding sites in the rat central nervous system. *J Chem Neuroanat.* 1990; 3(1): 59-76.

Orozco-Suárez S, Brunson LK, Feria-Velasco A, Ribak EC. Increased expression of gamma-aminobutyric acid transporter-1 in the forebrain of infant rats with corticotropin-releasing hormone-induced seizures but not in those with hyperthermia-induced seizures. *Epilepsy Res.* 2000; 42: 141-157.

Orozco-Suárez S, Feria-Velasco A. Febrile seizures induce neuronal death in the developing brain. *Epilepsia.* 2001; 42(Suppl. 7): 222 (Resumen).

Palma E, Spinelli G, Torchia G, Martinez-Torres A, Ragozzino D, Miledi R, Eusebi F. Abnormal GABA<sub>A</sub> receptors from the human epileptic hippocampal subiculum microtransplanted to *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 2004; 102(7): 2514-2518.

Parsell DA, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet.* 1993; 27: 437-496.

Patrylo PR, Spencer DD, Williamson A. GABA uptake and heterotransport are impaired in the dentate gyrus of epileptic rats and humans with temporal lobe sclerosis. *J Neurophysiol.* 2001; 85: 1533-1542.

Peña F, Barjas J, Tapia R. Paired pulse facilitation is turned into paired pulse depression in hippocampal slices after epilepsy induced by 4-aminopyridine in vivo. *Neuropharmacol.* 2002; 42(6): 807-812.

Peña F, Tapia R. Relationships among seizures extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: A microdialysis and electroencephalographic study. *J Neurochem.* 1999; 72: 2006-2014.

Peña F, Tapia R. Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience.* 2000; 101(3): 547-561.

Penner MR, Pinaud R, Robertson HA. Rapid kindling of the hippocampus protects against neural damage resulting from status epilepticus. *Neuro Report.* 2001; 12: 453-457.

Perez-Velazquez JL, Carlen PL. Synchronization of GABAergic interneuronal networks during seizure-like activity in the rat horizontal hippocampal slice. *Eur J Neurosci.* 1999; 11: 4110-4118.

Perry TI, Hansen S. Amino acid abnormalities in epileptogenic foci. *Neurology.* 1981; 31: 872-876.

Peterson SL, Armstrong JJ, Walker MK. Focal microinjection of carbachol into the periaqueductal gray induces seizures in the forebrain of the rat. *Epilepsy Res.* 2000; 42, (2-3): 169-181.

Pineau N, Charriaut-Marlangue M, Jacques NA. Pentylentetrazol seizures induce cell suffering but not death in the immature rat brain. *Dev Brain Res.* 1999; 112: 139-144.

Piredda S, Gale K. A crucial epileptogenic site in the deep prepiriform cortex. *Nature.* 1985; 317: 623-625.

Pirker S, Schwarzer C, Czech T, Baumgartner C, Pockberger H, Maier H, Hauer B, Sieghart W, Furtinger S, Sperk G. Increased expression of GABA(A) receptor beta-subunits in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003; 62(8): 820-834.

Pisa M, Sanber PR, Corcoran ME, Fibiger HC. Spontaneously recurrent seizures after intracerebral injections of kainic acid in rat: a possible model of human temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* 1980; 200:481-487.

Pitkänen A, Tuunanen J, Kälviäinen R, Partanen K, Salmenpera T. Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* 1998; 32: 233-253.

Plamondon H, Blondeau N, Heurteaux C, Lazdunski M. Mutually protective actions of kainic acid epileptic preconditioning and sublethal global ischemia on hippocampal neuronal death: involvement of adenosine A1 receptors and K(ATP) channels. *J Cereb blood Flow Met.* 1999; 19: 1296-1308.

Pohle W, Rauca C. Hypoxia protects against the neurotoxicity of kainic acid. *Brain Res.* 1994; 644: 297-304.

Poulter MO, Brown LA, Tynan S, Willick G, William R, McIntyre DC. Differential expression of  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  and  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptorsubunits in seizure-prone and seizure-resistant rat models of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci.* 1999; 19: (11): 4654-4661.

Pratt GD, Kokaia M, Bengzon J, Kokaia Z, Fritschy JM, Mohler H, Lindvall O. Differential regulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit messenger RNAs in kindling-induced epileptogenesis. *Neurosci.* 1993; 57(2): 307-318.

Prince HK, Conn PJ, Blackstone CD, Haganir RL, Levey AI. Down-regulation of AMPA receptor subunit GluR2 in amygdaloid kindling. *J Neurochem.* 1995; 64: 462-465.

Purdy HR, Morrow LA, Moore HP, Paul SM. Stress-induced elevations of  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 4553-4557.

Racine RJ. Modification of seizures activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroenceph Clin Neurophysiol.* 1972; 32:281-294.

Rall WT, Schleifer LS. Drugs effective in the therapy of the epilepsies. En: *The pharmacological basis of therapeutics.* (En Goodman-Gilman A, Rall WT, Nies AS, Taylor P. Pergamon Press) 1990; 436-462.

Regesta G, Tanganelli P. Biological bases of refractory epilepsies. Molecular and cellular targets for anti-epileptic drugs. (En: John Libbey and company Eds. London-England.) 1997; 217-229.

Rejdak R, Rejdak K, Sieklucka-Dziubar M, Stelmasiak Z, Grieb P. Brain tolerance and preconditioning. *Pol J Pharmacol.* 2001; 53, 73-79.

Rocha L, Ackerman RF, Engel J Jr. Chronic and single administration of pentylenetetrazol modifies benzodiazepine receptor-binding: an autoradiographic study. *Epilepsy Res.* 1996; 24: 65-72.

Rocha L, Ackermann RF, Chugani HT, Engel J Jr. Chronic pretreatment with naloxone modifies benzodiazepine receptor binding in amygdaloid kindled rats. *Epilepsy Res.* 1994; 17:135-144.

Rocha L, González Trujano ME, Jiménez G, Gaona A, Ondarza R. Characterization of benzodiazepine receptor binding in immature rat brain after kainic acid administration. *Epilepsia.* 2000; 41(Suppl 6):S44-S47.

Rocha L, Ondarza-Rovira R. Characterization of benzodiazepine receptor binding following kainic acid administration: an autoradiography study in rats. *Neurosci Lett.* 1999; 262: 211-214.

Rocha L, Tatsukawa K, Chugani HT, Engel J Jr. Benzodiazepine receptor binding following chronic treatment with naloxone, morphine and met-enkephalin in normal rats. *Brain Res.* 1993; 612:247-252.

Rupprecht R, Holsboer F. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci.* 1999; 22(9): 410-416.

Salazar P, Tapia R, Rogawski AM. Effects of neurosteroids on epileptiform activity induced by picrotoxin and 4-aminopyridine in the rat hippocampal slice. *Epilepsy Res.* 2003; 55: 71-82.

Salmenpera T, Kälviäinen R, Partanen K, Pitkänen. Quantitative MRI volumetry of the entorhinal cortex in temporal lobe epilepsy. *Seizure*. 2000; 9: 208-215.

Sasahira M, Lowry T, Simon RP, Greenberg DA. Epileptic tolerance: prior seizures protect against seizure-induced neuronal injury. *Neurosci Lett*. 1995(185): 95-98.

Sata Y, Matsuda K, Mihara T, Aihara M, Yagi K, Yonekura Y. Quantitative analysis of benzodiazepine receptor in temporal lobe epilepsy:  $^{125}$ Iomazenil autoradiographic study of surgically resected specimens. *Epilepsia*. 2002; 43(9): 1039-1048.

Savic I, Roland P, Sedvall G, Persson A, Pauli S, Widwn L. In vivo demonstration od reduced benzodiazepine receptor binding in human epileptic foci. *Lancet*. 1988: 863-866.

Schwarzer C, Tsunashima K, Wanzenbock C, Fuchs K, Sieghart W, Sperk G. GABA (A) receptor subunits in the rat hippocampus II: altered distribution in kainic acid-induced temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 1997; 80(4):1001-1017.

Serles W, Caramanos Z, Lindinger G, Patariaia E, Baumgartner C. Combining ictal surface-electroencephalography and seizure semiology improves patient lateralization in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2000; 41(2): 1567-1573.

Sherwin A, Robitaille Y, Quesney F, Oliver A, Villemure J, Leblanc R, Feindel W, Andermann E, Gotman J, Andermann F. Excitatory amino acid are elevated in human epileptic cerebral cortex. *Neurology*. 1988; 38(6): 920-923.

Shin C, Pedersen HB, McNamara JO.  $\gamma$ -Aminobutyric acid and benzodiazepine receptors in the kindling model of epilepsy: A quantitative radiohistochemical study. *J Neurosci*. 1985; 5(10):2696-2701.

Shin RS, Anisman H, Merali Z, McIntyre. Amygdala amino acid and monoamine levels in genetically fast and slow kindling rat strains during

massed amygdala kindling: a microdialysis study. *J Neurosci.* 2004; 20: 185-194.

Sieklucka M, Heim C, Block F, Sontag KH. Transient reduction of cerebral blood flow leads to long-lasting increase in GABA content in vulnerable structures and decreased susceptibility to bicuculline induced seizures. *J Neural Transm.* 1992; 88: 87-94.

Sloviter RS. Feedforward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation: GABA-mediated mechanisms that regulate excitability in vivo. *Hippocampus.* 1991; 1: 31-40.

Sperber EF, Veliskova J, Germano IM, Friedman LK, Moshe SL. Age-dependent vulnerability to seizures. *Adv Neurol.* 1999; 79: 161-169.

Staley KJ, Soldo BL, Proctor WR. Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA<sub>A</sub> receptors. *Science.* 1995; 269: 977-981.

Stell MB, Brickley GS, Tang YC, Farrant M, Mody I. Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by  $\delta$  subunit-containing GABA<sub>A</sub> receptors. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100(24): 14439-14444.

Streit WJ, Kincaid-Colton CA. The brain's immune system. *Sci Am.* 1995; 273: 54-61.

Suzuki T, Wellman SE, Ho IK. An autoradiographic study of [3H]flunitrazepam binding sites in the brain of rat made tolerant to and dependent on pentobarbital. *Eur J Pharmacol.* 1996; 295(2-3): 169-179.

Tauck DL, Nadler JV. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci.* 1985; 5: 1016-1022.

Thompson HJ, Tkacs NC, Saatman KE, Raghupathi R, McIntosh TK. Hyperthermia following traumatic brain injury: a critical evaluation. *Neurobiol Dis* 2003; 12(3): 163-173.

Titulaer GNM, Kamphuis W, Lopez da Silva HF. Long-term and regional specific changes in [<sup>3</sup>H]flunitracepam binding in kindled rat hippocampus. *Neuroscience*. 1995; 68(2): 399-406.

Titulaer GNM, Kamphuis W, Pool WC, Van Heerikhuize JJ, Lopes da Silva HF. Kindling induces time-dependent and regional specific changes in the [<sup>3</sup>H]muscimol binding in the rat hippocampus: A quantitative autoradiographic study. *Neuroscience*. 1994; 59(4): 817-826.

Tomimatsu T, Fukuda H, Endoh M, Mu J, Kanagawa T, Hosono T, Kanzaki T, Doi K, Kubo T, Murata Y. Long-term neuroprotective effects of hypothermia on neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats, assessed by auditory brainstem response. *Pediatr Res*. 2003; 53(1): 57-61.

Toth Z, Yan XX, Haftoglou S, Ribak CE, Baram TZ. Seizure-induced neuronal injury: vulnerability to febrile seizure in an immature rat model. *J Neurosci*. 1998; 18(11):4285-4294.

Treiman MD. Gabaergic mechanisms in epilepsy. 2001; 42(Suppl. 3): 300-303.

Trinka E, Unterrainer J, Haberlandt E, Luef G, Unterberger I, Niedermüller U, Hffner B, Bauer G. Childhood febrile convulsions-wich factors determine the subsequent epilepsy syndrome? A retrospective study. *Epilepsy Res*. 2002; 50: 283-292.

Tsuchiya D, Hong S, Matsumori Y, Kayama T, Swanson RA, Dillman WH, Liu J, Panter SS, Weinstein PR. Overexpression of rat heat shock protein 70 reduces neuronal injury after transient focal ischemia, transient global ischemia, or kainic acid-induced seizures. *Neurosurgery*. 2003; 53: 1179-1188.

Turner R, Jones T. Techniques for imaging neuroscience. *British Medical Bull*. 2003; 65: 3-20.

Ueda Y, Doi T, Tokumaru J, Yokoyama H, Nakajima A, Mitsuyama Y, Ohya-Nishiguchi H, Kamada H, Willmore J. Collapse of extracellular glutamate regulation during epileptogenesis: down-regulation and functional failure of glutamate transporter function in rats with chronic seizures induced by kainic acid. *J Neurochem*. 2001; 76: 892-900.

Ueda Y, Tsuru N. Simultaneous monitoring of the seizure-related changes in extracellular glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid concentration in bilateral hippocampi following development of amygdaloid kindling. *Epilepsy Res.* 1995; 20: 213-219.

Ullal G, Fahnestock M, Racine R. Time-dependent effect of kainate-induced seizures on glutamate receptor GluR5, GluR6 and GluR7 mRNA and protein expression in rat hippocampus. *Epilepsia.* 2005; 46(5): 616-623.

Van Hoesen GW, Pandya DN. Some connections of the entorhinal (area 28) and perirhinal (area 36) cortices of the rhesus monkey. I. Temporal lobe afferents. *Brain Res* 1975; 95: 1-24.

Van Landingham KE, Heinz ER, Cavazos JE, Lewis D V. Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal injury after prolonged focal febrile convulsions. *Ann Neurol.* 1998; 43:413-426.

Van Paesschen W, Connelly A, Johnson CL, Duncan JS. The amygdala and intractable temporal lobe epilepsy: a quantitative magnetic resonance imaging study. *Neurology.* 1996; 47(4): 1021-1031.

Velisek L, Kusá R, Kulovaná M, Mares P. Excitatory amino acid antagonists and pentylentetrazol-induced seizures during ontogenesis. I: the effects of 2-amino-7-phosphonoheptanoate. *Life Sci.* 1990; 46: 1349-1357.

Veliskova J, Velisek L, Nunes ML, Moshé SL. Developmental regulation of regional functionality of substantia nigra GABA<sub>A</sub> receptors involved in seizures. *Eur J Pharmacol.* 1996; 309:167-173.

Vezzani A, Serafini R, Samanin R, Foster AC. Autoradiographical analysis of excitatory amino acid binding sites in rat hippocampus during the development of hippocampal kindling. *Brain Res.* 1990; 526: 113-121.

Wallace RH, Marini C, Petrou S, Harkin LA, Bowser DN, Panchal RG, Williams DA, Sutherland GR, Mulley JC, Scheffer IE, Berkovic SF. Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat Genet.* 2001; 28(1): 49-52.

Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M. Effectiveness and Efficiency of Surgery for Temporal Lobe Epilepsy Study Group. A randomized, controlled

trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N Engl J Med.* 2001; 345(5): 311-318.

Wilson CL, Maidment NT, Shomer MH, Behnke EJ, Ackerson L, Fried I, Engel J. Comparison of seizure related amino acid release in human epileptic hippocampus versus a chronic, kainate rat model of hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res.* 1996; 26: 245-254.

Wu J, Ellsworth K, Ellsworth M, Schroeder KM, Smith K, Fisher RS. Abnormal benzodiazepine and zinc modulation of GABAA receptors in an acquired absence epilepsy model. *Brain Res.* 2004; 1013(2): 230-240.

Wu J, Fisher RS. Hyperthermic spreading depression in the immature rat hippocampal slice. *J Neurophysiol.* 2000; 84: 1355-1360.

Xu H, Aibiki M, Nagoya J. Neuroprotective effects of hyperthermia preconditioning on infarcted volume after middle cerebral artery occlusion in rats: role of adenosine receptors. *Crit Care Med.* 2002; 30: 1126-1130.

Yager JY, Asselin J. The effect of pre hypoxic-ischemic (HI) hypo and hyperthermia on brain damage in the immature rat. *Brain Res Dev.* 1999; 117(2): 139-143.

Yang XF, Chang JH, Rothman SM. Intracerebral temperature alterations associated with focal seizures. 2002; 52: 97-105.

Yasargil MG, Teddy PJ, Roth P. Selective amygdalo-hippocampectomy. Operative anatomy and surgical technique. *Adv Tech Stand Neurosurg.* 1985; 12: 93-123.

Yonekawa DW, Kupferberg JH, Woodbury MD. Relationship between pentylenetetrazol-induced seizures and brain pentylenetetrazol levels in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1980; 214(3): 589-593.

Zhang P, Abraham VS, Kraft KR, Rabchevsky AG, Scheff SW, Swain JA. Hyperthermia preconditioning protects against spinal cord ischemic injury. *Ann Thorac Surg.* 2000; 70: 1490-1495.