

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**ESTUDIO MOLECULAR DE LAS ALTERACIONES EN LA
NEUROTRASMISIÓN GABAÉRGICA, EN TEJIDO DE PACIENTES
CON CIRUGÍA DE EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL
REFRACTARIOS A TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS
P R E S E N T A
BIOL. EXP. DAVID ESCALANTE SANTIAGO**

DIRECTOR DE TESIS

DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUÁREZ

CO-DIRECTOR DE TESIS

DR. HUMBERTO NICOLINI SÁNCHEZ

MÉXICO, D.F.

Octubre 2009

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

Comité tutorial:

Director:

Dra. Sandra Adela Orozco Suárez (UIMEN, CMN S. XXI)

Co-dierctor:

Dr. Humberto Nicolini Sánchez (UACM)

Asesores:

Dra. Luisa Rocha Arrieta (CINVESTAV, Sede Sur)

Dra. Sara Frías Vázquez (INP/UACM)

Dra. Iris Angélica Feria Romero (UIMEN, CMN S. XXI)

Dra. Mavil López Casamichana

*Este trabajo fue realizado gracias al apoyo del Fondo de Investigación en Salud a través del proyecto FIS/IMSS/PROT/548 en la **Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas. Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI.***



**UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN
ENFERMEDADES NEUROLOGICAS,
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN
SIGLO XXI**

*No dejes que la esperanza huya y
no permitas que se aparte. Ten
certeza que ella iluminará tu
camino, sé siempre positivo y
agradece todo a Dios. Se siempre
felíz y contagia a otras personas tu
felicidad.*

AGRADECIMIENTOS

Dra. Sandra Orozco Suárez

Por la paciencia y confianza que deposito en mí, por brindarme todos sus conocimientos y sabios consejos así como los comentarios constructivos que me han permitido dar un paso más en el camino del saber.

Dr. Humberto Nicolini Sánchez

Por formar parte del comité tutorial, por los comentarios y sugerencias que nos llevaron a realizar con éxito todo el trabajo experimental.

Asesores-lectores:

Dra. Luisa L. Rocha Arrieta, Dra. Sara Frías Vázquez y Dra. Mavil López Casamichana

Por sus comentarios y sugerencias durante el desarrollo de la tesis.

Dra. Iris A. Feria Romero

Por dedicar tiempo y esfuerzo en orientarme en el aspecto técnico durante la realización de los trabajos experimentales.

Colegio de profesores de la UACM

Por compartir sus conocimientos y guiarnos por el sendero cuyo final permite alcanzar el éxito y la satisfacción de aplicar los conocimientos adquiridos en el mejoramiento de la salud humana.

Compañeros de laboratorio

Por su apoyo moral, intelectual y técnico durante la realización de la tesis.

Dra. Minerva Camacho

Por la paciencia y fe mostrados durante toda mi estancia en esta honorable universidad.

A mi madre.

Mamita le doy gracias a Dios por permitirme dar un paso más en mi carrera y por haberme dado una madre ejemplar, que día a día me llena de ánimos y me llena de amor y sabios consejos. Gracias por dedicar minutos de tu valiosa vida en enseñarme el camino que conduce al éxito y la felicidad, gracias por los castigos y las prohibiciones que durante mi niñez y adolescencia recibí y que en su momento me hicieron pensar que no me querías y que hoy puedo darme cuenta que la única intención de cada sermón y castigo era para decirme cuanto me amas y que querías lo mejor para mí.

Lo que dice la tesis al lector

No me abras solo para ver mi contenido. No humedezcas las yemas de tus dedos para mover mis hojas; no tosas sobre mí; y no me tomes sino con las manos limpias. Me sentiría si sucio me prestases a otro, para leer. No anotes nada en mis hojas, ni con la pluma, ni con el lápiz. No me cojas por las tapas, y cuando me leas, no te apoyes sobre mí, ni con los codos ni con los brazos, me harías mal. No me dejes besar con las hojas la mesa o el sofá.

No pongas nunca entre mis hojas un cabo de pluma, lápiz u otra cosa que sea más gruesa que una hoja de papel, cansarías mi lomo. Si cuando acabes de leer temes no acordarte donde te quedaste, no pliegues la hoja, emplea una cinta o una tira de papel, son mis mejores amigos. Entonces ciérrame y déjame sobre la mesa hasta que quieras leerme otra vez. Acuérdate que solo debo estar contigo cuando me leas, pues tal vez sea buscado por otro a quien quiero complacer. Cuídame mucho pues quizá algún día llegue a tus manos otra vez, y no te gustaría verme viejo, sucio y manchado. Tenme siempre limpio y bien cuidado. En cambio yo te ayudare a ser feliz y te daré más ánimo para librar tu futura dicha.

ÍNDICE GENERAL

Índice de tablas	i
Índice de figuras	i
Glosario de abreviaturas	iii
Resumen.....	1
I. Introducción	3
II. Epilepsia refractaria al tratamiento farmacológico	8
II.1 Teoría de los mecanismos de la ERTRAFAR	11
III. Neurotransmisión GABAérgica	16
II.1 Síntesis del ácido γ - aminobutírico (GABA)	19
II.2 Receptores de GABA	22
II.3 Transportadores de GABA (GAT)	27
IV. Antecedentes	30
V. Justificación.....	33
VI. Planteamiento del problema	35
VII. Hipótesis	36
VIII. Objetivos	37
IX. Protocolo Experimental	38
IX.1 Diseño experimental	38
IX.2 Obtención de la muestra	38
IX.3 Criterios de selección	39
IX.4 Extracción de RNA total	40

IX.5	Síntesis de cDNA por retrotranscripción (RT)	41
IX.6	Amplificación de cDNA mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	42
X.	Análisis estadístico de los resultados	43
XI.	Resultados	45
XI.1	Datos clínicos de los casos analizados	45
XI.2	Expresión de las moléculas transportadoras de GABA (GAT-1 y GAT-3) en tejido hipocampal con ERTRAFAR	47
XI.3	Expresión de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD-67) en tejido hipocampal con ERTRAFAR	47
XI.4	Expresión de las subunidades del receptor GABA _A en tejido hipocampal con ERTRAFAR.....	50
XI.5	Expresión de las moléculas trasportadores de GABA (GAT-1 y GAT-3) en tejido cortical con ERTRAFAR	55
XI.6	Expresión de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD 67) en corteza temporal	57
XI.7	Expresión de las subunidades del receptor GABA _A en tejido cortical de pacientes con ERTRAFAR	59
XI.8	Correlaciones entre los niveles de expresión del RNAm de GAD-67, GAT-1, GAT-3, y de cada una de las subunidades del receptor GABA _A vs datos clínicos	65
XI.8.1	Correlación de la edad en la que el paciente presento la primera crisis epiléptica y, los niveles de expresión del	

RNAm de los transportadores GAT-1 y GAT-3, de GAD-67 y, de las subunidades del receptor GABA _A en corteza temporal e hipocampo	65
XI.8.2 Correlación de los años con crisis epilépticas y, los niveles de expresión del RNAm de los transportadores GAT-1 y GAT-3, de GAD-67 y, de las subunidades del receptor GABA _A en corteza temporal e hipocampo	67
XI.8.3 Correlación de la frecuencia de las crisis epilépticas y, los niveles de expresión del RNAm de los transportadores GAT-1 y GAT-3, de GAD-67 y, de las subunidades del receptor GABA _A en corteza temporal e hipocampo	69
XI.8.4 Correlación de los años con tratamiento antiepiléptico y, los niveles de expresión del RNAm de los transportadores GAT-1 y GAT-3, de GAD-67 y, de las subunidades del receptor GABA _A en corteza temporal e hipocampo	71
XII. Discusiones	73
XIII. Conclusiones	89
XIV. Perspectivas	91
XV. Bibliografía	92
Anexos	107

Índice de tablas.

Tabla 1 Datos clínicos de los casos analizados	45
Tabla 2. Comparación de las variables clínicas de los dos grupos de pacientes	46

Índice de figuras.

Figura 1. Resonancia magnética nuclear que muestra la presencia de esclerosis hipocampal	7
Figura 2. Representación esquemática de las teorías de los mecanismos de refractariedad en ELT	15
Figura 3. Neurotransmisión GABAérgica en el cerebro	18
Figura. 4. Metabolismo de GABA	21
Figura 5. Receptor ionotrópico GABA _A	26
Figura 6. Sistema de recaptura de GABA en la hendidura sináptica	29
Figura 7. Condiciones de amplificación de cada uno de los genes	43
Figura 8. Expresión del RNAm de los transportadores de GABA en hipocampo	48
Figura 9. Expresión del RNAm de GAD 67 en hipocampo	49
Figura 10. Expresión del RNAm de la subunidad alfa en hipocampo	51
Figura 11. Expresión del RNAm la subunidad Beta en hipocampo	53
Figura 12. Expresión de la subunidad Gamma en hipocampo	54
Figura 13. Expresión del RNAm de los transportadores de GABA en corteza	56
Figura 14. Expresión del RNAm de GAD 67 en corteza	58
Figura 15. Expresión del RNAm de la subunidad alfa en corteza	60
Figura 16. Expresión del RNAm la subunidad Beta en corteza	63

Figura 17. Expresión del RNAm de la subunidad Gamma en corteza	64
Figura 18. Correlación de la expresión del RNAm de las subunidades del receptor GABA _A en corteza temporal VS edad de la primera crisis epiléptica	66
Figura 19. Correlación de la expresión del RNAm de las subunidades del receptor GABA _A en corteza VS años con crisis epilépticas	68
Figura 20. Correlación entre la expresión del RNAm de las subunidades del receptor GABA _A VS el número de crisis epilépticas	70
Figura 21 Correlación entre la expresión del RNAm de las subunidades del receptor GABA _A VS años de tratamiento	72
Figura 22. Metabolismo normal de la neurotransmisión GABAérgica	87
Figura 23. Modificaciones significativas en la expresión del RNAm en los componentes de la neurotransmisión GABAérgica	88

Glosario de abreviaturas.

AVP: Ácido valproico

BHE: Barrera Hematoencefálica

BGT-1: Transportador GABA/Betaina

cDNA: DNA complementario

CBZ: carbamazepina

DAEs: Fármacos antiepilépticos

Der: derecho

DFH: Difenilhidantoína

EGG: Electroencefalograma

ELT: Epilepsia del Lóbulo Temporal

ERTRAFAR: Epilepsi Refractaria a Tratamiento Farmacológico

F: Femenino

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GABA_A: Receptor de GABA_A

GABA_B: Receptor GABA_B

GAD: glutamato descarboxilasa

GAT: transportadores de GABA

Izq: Izquierdo

KDa: kilo Dalton

M: masculino

mg: miligramos

mL: mililitros

min: minutos

MDT's: transportadores de multi-fármacos

MRP's: proteínas asociadas a la resistencia a multi-fármacos

OMS: Organización Mundial de la Salud

OXC: Oxcarbamazepina

Pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

PLP: Fosfato de Piridoxal

PRM o PMD: Primidona

RNA: Ácido ribonucleico

RNA_m: RNA mensajero

RT: Retrotranscripción

SD: desviación estándar

Seg: segundos

SNC: Sistema Nervioso Central

VDI: valores de densidad integrados

α : subunidad alfa

β : subunidad beta

γ : subunidad gamma

μg : microgramos

μL : microlitros

$^{\circ}\text{C}$: grados centígrados

Resumen.

La epilepsia es un padecimiento neurológico que afecta del 1 al 2% de la población mundial y en México su prevalencia oscila entre 1.8 y 2% de la población general de los cuales una tercera parte son refractaria al tratamiento farmacológico (ERTRAFAR). La ERTRAFAR se refiere a la presencia de crisis convulsivas de cualquier tipo con una frecuencia superior a 3 veces por mes por lo menos durante seis meses de tratamiento continuo, con dos o más fármacos a dosis adecuadas, y niveles séricos dentro de los límites terapéuticos, con electroencefalograma anormal por la presencia de actividad de tipo irritativo, y con estudios de imagen que descarten una patología estructural. Los mecanismos de la resistencia son multifactoriales, y pueden incluir alteraciones en los blancos moleculares y en el transporte de los neurotransmisores. Basados en estudios experimentales y clínicos se han desarrollado dos teorías para explicar la refractariedad: a) la teoría de los transportadores a multi-fármacos, la cual propone una sobre expresión de los transportadores de fármacos en la barrera hematoencefálica como la glicoproteína P, y b) la teoría de los blancos la cual propone que los DAEs (fármacos antiepilépticos) pierden su efectividad por alteraciones en sus blancos terapéuticos como lo son canales iónicos, receptores de los neurotransmisores, así como enzimas metabólicas involucradas en la liberación, recaptura y metabolismo de los neurotransmisores. El objetivo del presente trabajo fue evaluar las modificaciones en la expresión del RNAm de las subunidades que componen el receptor GABA_A y de su transportador en el tejido de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal

refractarios a tratamiento. Para este estudio se incluyeron 14 casos de pacientes que fueron sometidos a cirugía por ELT y que además, presentaban esclerosis hipocámpal; así como, 4 controles obtenidos de autopsia. Se obtuvo RNA total de hipocampo y corteza (fenol-cloroformo). La expresión del RNAm se analizó mediante RT-PCR y se cuantificó por densitometría. Los resultados en hipocampo mostraron una sobre expresión del RNAm de GAD-67, de las subunidades alfa 1, alfa 4, y gamma 2 y una disminución en la expresión del RNAm del transportador GAT-3 y de las subunidades alfa 2, alfa 3, beta 1 y beta 2, mientras que la corteza temporal mostró una sobre expresión en el transportador GAT-1, las subunidades alfa 1, alfa 2, alfa 4 y alfa 6, beta 1 y beta 3, las subunidades gamma 1 y gamma 2, mientras que gamma 3 mostró una reducción en la expresión del RNAm. En conclusión, los resultados sugieren que los cambios registrados en la expresión del RNAm de los transportadores (GAT-1 y GAT-3) y de GAD-67 son probablemente cambios compensatorios que tratan de revertir la hiperexcitabilidad neuronal así como la sincronización anormal que se genera por la presencia de crisis, mientras que las alteraciones en las subunidades del receptor GABA_A, pueden ser producto de las condiciones fisiopatológicas de la ERTRAFAR, generando un desequilibrio estructural en el receptor, modificando la sensibilidad para reconocer sus ligandos (GABA o fármacos antiepilépticos), lo que apoya la teoría farmacodinámica (blancos terapéuticos) de la resistencia al tratamiento farmacológico.

I. Introducción.

La epilepsia es un padecimiento neurológico que afecta del 1 al 2% de la población mundial y en México su prevalencia oscila entre 1.8 y 2% de la población general, lo que representa más de un millón de pacientes con este padecimiento (Brown y Holmes, 2001; Programa prioritario de Epilepsia. 2001).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la epilepsia es la presentación crónica y recurrente de fenómenos paroxísticos por descargas eléctricas anormales en el cerebro con manifestaciones clínicas variadas y causas muy diversas. El término de crisis epiléptica se refiere a una alteración transitoria debido a descargas repetitivas, sincronizadas y anormales de poblaciones neuronales en el sistema nervioso central. La sincronización anormal y la descarga neuronal observadas en la epilepsia es el resultado de la interacción de varios factores (McNamara, 1992) entre los cuales destacan la habilidad de grupos de neuronas para generar descargas intrínsecas; la incapacidad de los mecanismos inhibitorios, como el GABAérgico, para contrarrestar las crisis epilépticas y el aumento de la transmisión sináptica excitadora, especialmente la glutamatérgica (McNamara, 1994).

La clasificación vigente de las crisis epilépticas fue creada en 1981 por una asociación que agrupa a neurólogos expertos en epilepsia conocida como Comité de Clasificación y Terminología de la Liga Internacional Contra la Epilepsia. Tomando

como criterios de clasificación las manifestaciones clínicas y electroencefalográficas (EEG), tanto ictales como interictales de las crisis epilépticas, los grupos resultantes y sus características se clasificaron en dos categorías, crisis parciales conocidas como focales o localizadas y las crisis generalizadas. Las crisis generalizadas a diferencia de las crisis parciales, involucran ambos hemisferios y se dividen a su vez en crisis de ausencia, mioclónicas, tónicas, clónicas, tónico-clónicas y atónicas. Las crisis parciales son consecuencia de la disfunción de una región cerebral con un EEG de descarga localizada, que dura de segundos a pocos minutos. A su vez, las crisis parciales pueden ser simples las cuales no presentan alteración de la conciencia, y parciales complejas dónde se presenta alteración de la conciencia o secundariamente generalizadas (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1981; Programa prioritario de Epilepsia, 2001).

Entre el grupo de las crisis parciales focales, la epilepsia del lóbulo temporal “ELT” es el tipo más frecuente de crisis parcial compleja ya que se presenta en el 40% de todos los casos de epilepsia (McNamara, 1994). Este tipo de epilepsia se origina por una anomalía intrínseca del lóbulo temporal e involucra estructuras cerebrales que forman parte del sistema límbico (Sutula, 1990; Lothman, 1996); se caracteriza no solo por la presencia de crisis parciales las cuales tienden a generalizarse sino también por la generación de múltiples focos epilépticos (Engel, 1996); este padecimiento puede ser progresivo y frecuentemente llega a ser refractario al tratamiento farmacológico (Sutula, 1990).

El sistema límbico es la región dónde se originan las crisis epilépticas, se compone de estructuras corticales y subcorticales que abarca el lóbulo temporal hasta la parte superior del tallo cerebral, incluyendo la formación hipocampal. Las estructuras subcorticales como hipocampo, amígdala, septum, hipotálamo y epítálamo son las más involucradas en la ELT (figura 3), siendo el hipocampo la estructura que principalmente contribuye a la fisiopatología de este padecimiento, desarrollando el foco epiléptico, descrita como zona epileptogénica o área del encéfalo necesaria y suficiente para iniciar las crisis y cuya resección o desconexión es requerida para que las mismas cesen (Ebner, 2001). Lo anterior ha sido confirmado en diferentes estudios realizados en modelos animales, en los cuales se ha demostrado que las crisis recurrentes producen alteraciones estructurales y electrofisiológicas en las vías hipocampales (Sutula, 1990). Con respecto a los estudios clínicos el 66% de los pacientes con ELT y refractarios al tratamiento farmacológico desarrollan esclerosis hipocampal o esclerosis mesial temporal como la principal anormalidad histológica (figura 1), que se caracteriza por una pérdida excesiva de las principales neuronas del hipocampo y una excesiva proliferación glial en la región hilar del giro dentado así como, de las regiones CA1 y CA3 (McNamara, 1994; Lothman, 1996; Sutula y cols., 1994). El foco epiléptico puede reclutar otras zonas del encéfalo como la corteza, transformándola en focos secundarios formando la zona de propagación. En modelos de ELT, la corteza piriforme es el área cortical principalmente involucrada en la generación y propagación de las descargas epilépticas (Piredda y Gale, 1985; McIntyre y Plant, 1989), no solo por ser el área sensorial primaria sino porque su organización

neuronal y sistema de fibras neurales pueden participar en los mecanismos patológicos que permiten las crisis epilépticas, funcionando también como un amplificador de las crisis epilépticas (Löscher y Eber, 1996).

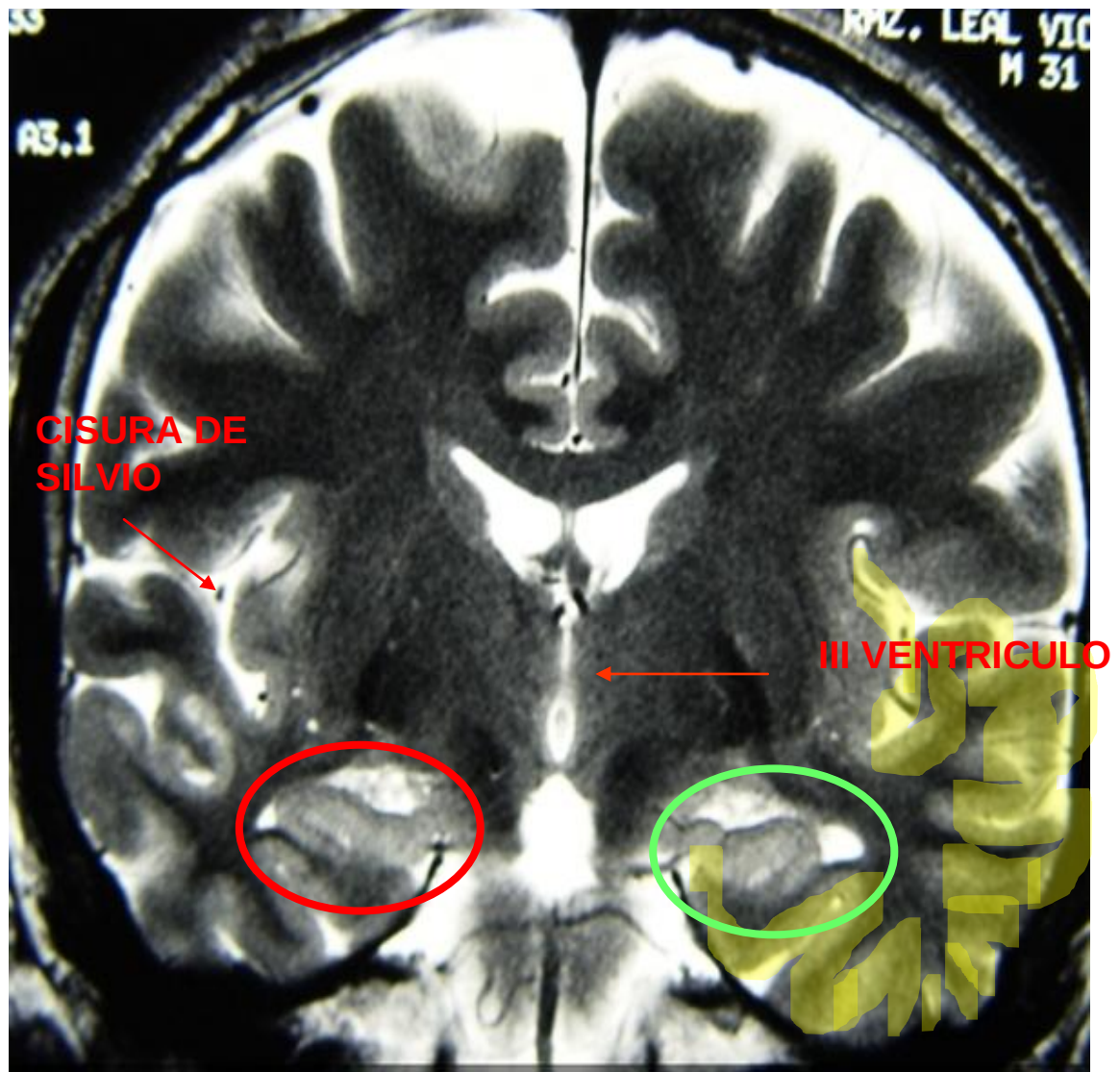


Figura 1. Corte coronal de una resonancia magnética nuclear que muestra la presencia de esclerosis hipocampal en un individuo con ERTRAFAR. La zona resaltada en amarillo representa el lóbulo temporal derecho. El círculo rojo señala la localización del hipocampo izquierdo anatómicamente normal, y el círculo verde señala la localización del hipocampo derecho, en el que se observan cambios estructurales indicativos de esclerosis.

II. Epilepsia refractaria al tratamiento farmacológico.

El tratamiento adecuado para el control de las crisis es la administración de fármacos antiepilépticos (DAEs), y su elección depende del tipo de crisis, tolerabilidad y seguridad (Brown y Holmes, 2001). Sin embargo en una tercera parte de los pacientes epilépticos las crisis persisten a pesar del uso de dos o tres DAEs, la estricta vigilancia de un neurólogo y niveles séricos adecuados del tratamiento (Sander, 1993; Regesta y Tanganelli, 1999). A este tercio de pacientes se les conoce como epilépticos fármaco-resistentes o epilépticos refractarios a tratamiento farmacológico “ERTRAFAR”.

Hoy en día, a pesar del conocimiento sobre la resistencia a fármacos no se tiene una definición homogénea de epilepsia refractaria. Löscher y Potschka (2002), definen epilepsia refractaria como crisis incontroladas a pesar del uso de dos o tres fármacos considerados de primera línea recetados para el control del síndrome epiléptico. Prasad y col., (2001) señalan que el estado epiléptico refractario, se presenta cuando las crisis duran más de 2 horas o cuando se presentan crisis recurrentes en dos o mas episodios por hora sin recobrar la línea basal entre crisis después del tratamiento con los DAE's convencionales. Para la Asociación Nacional Central de Epilepsia, la fármacorresistencia se define como crisis incontroladas después de 9 meses de tratamiento y bajo la supervisión de un neurólogo (National Association of Epilepsy Center, 1990). El concepto de refractariedad acuñado en este estudio, Se refiere a la presencia de crisis convulsivas de cualquier tipo con una

frecuencia superior a 3 veces por mes, bajo tratamiento con dos o más fármacos a dosis adecuadas, con niveles séricos dentro de los límites terapéuticos, por lo menos durante seis meses de tratamiento continuo, con electroencefalograma anormal por la presencia de actividad de tipo irritativo y con estudios de imagen que descarten patología estructural. (Comité de epilepsia y neurocirugía del INNN, México D.F.).

La prevalencia a nivel mundial de los pacientes epilépticos y con ERTAFAR oscila entre 31 y 44% de todos los pacientes con crisis epilépticas (Holtkamp y col., 2005), de los cuales el 75% de los pacientes adultos con ELT que están bajo tratamiento son considerados pacientes refractarios por la baja efectividad de los fármacos en el control adecuado de las crisis (Holmes, 2004; Schmidt y Löscher, 2005). En México las instituciones de salud atienden más del 75% de los pacientes con epilepsia, con un costo por paciente de \$ 2700 dólares/año. El número de pacientes epilépticos registrados y bajo un control estricto es de 2200000, de los cuales 730000 pacientes son considerados refractarios a tratamiento (García-Contreras y cols., 2006).

A pesar del progreso en el entendimiento de la patogénesis de las crisis, hay poca información de las bases fisiopatológicas para muchos tipos de convulsiones y síndromes epilépticos (Lothman, 1996; Sutula y cols., 1994; Loscher y Schmidt, 2006), siendo el principal obstáculo para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento contra la ERTAFAR. A nivel clínico los factores que se asocian con la

resistencia incluyen el inicio temprano de las crisis (antes del primer año de edad), frecuencia elevada de crisis antes del inicio del tratamiento, historia de crisis febriles, el tipo de crisis (cerca del 60% de los pacientes con epilepsia intratable sufren de crisis parciales) o epilepsia, lesiones estructurales cerebrales, malformaciones del desarrollo cortical e inclusive tumores neuroepiteliales desembrionoplásticos (Semah y cols., 1998; Regesta y Tanganelli, 1999; Sisodiya y cols., 2002). A nivel molecular los factores que se asocian a la ERTRAFAR son los factores genéticos, que se relacionan con polimorfismos de genes que codifican para receptores, transportadores, neurotransmisores, entre otras involucradas en la fisiopatología de las crisis epilépticas, lo cual es importante ya que puede explicar porque dos pacientes con el mismo tipo de crisis o epilepsia difieren en su respuesta al fármaco. Por otro lado, los factores relacionados con enfermedades causantes de los cambios anatómico-estructurales, incluyendo la etiología de las crisis. Por último, los factores relacionados con fármacos, los cuales se relacionan con la insuficiencia del control de las crisis, incluyendo pérdida en la eficacia anticonvulsivante durante el tratamiento por alteración en los blancos terapéuticos o alteración en el sistema de recaptura de fármacos en el cerebro lo cual lleva a desarrollar tolerancia farmacológica que a la postre se traduce en epilepsia refractaria (Löscher y Potschka, 2002). Y, a nivel celular la epilepsia se asocia con una reorganización anormal de los circuitos neuronales, la alteración en los receptores de diversos neurotransmisores, patologías en los canales iónicos, la autoinmunidad reactiva y/o la penetración alterada de los fármacos antiepilépticos en el foco epiléptico por

posibles alteraciones a nivel de la barrera hematoencefálica (BBB) (Kwan y Brodie, 2002; Löscher y Potschka, 2002).

II.1. Teorías de los mecanismos de la ERTRAFAR.

Para explicar los mecanismos o factores que llevan a la refractariedad en la epilepsia, se han postulado varias teorías de las cuales las dos más importantes son la teoría de los blancos terapéuticos y la teoría del transportador a multi-fármacos (Löscher y Schmidt, 2001).

a) Teoría de los blancos terapéuticos.

Esta teoría se basa en los cambios adquiridos o intrínsecos que han sufrido las biomoléculas, es decir, los blancos terapéuticos reconocidos por los DAEs para el control de las crisis, como lo son canales iónicos, receptores de los neurotransmisores, así como enzimas metabólicas involucradas en la liberación, recaptura y metabolismo de los neurotransmisores. Dependiendo de su mecanismo de acción sobre los blancos terapéuticos los DAEs se pueden clasificar en aquellas que actúan modulando los canales iónicos dependientes de voltaje (canales de sodio calcio y potasio); las que inhiben la excitación sináptica bloqueando receptores de glutamato y las que aumentan la inhibición sináptica actuando como agonista de

GABA (Rogawski y Löscher, 2004) en donde se encuentran la gran mayoría de las DAEs.

Para fundamentar la teoría de los blancos terapéuticos se han realizado estudios sobre el efecto que tienen algunas DAEs como carbamazepinas (CBZ) sobre los canales de sodio y su receptor en neuronas hipocampales, ya que estos antiepilépticos reducen la máxima amplitud de las canales de sodio, generan cambios en las corrientes de sodio dependientes de voltaje reduciendo el número de canales de sodio disponibles y, por último, provocan una recuperación lenta en la inactivación de estos canales (Rogawski y Löscher, 2004). El grupo de Wytse Wadman's (Vreugdenhil, 1998) fueron los primeros en reportar el efecto de la CBZ en pacientes con ETL y con esclerosis mesial, así como en el modelo de kindled en ratas (Vreugdenhil y Wadman, 1999), observando que este fármaco pierde el 50 % de su efecto en la modulación de los canales de sodio. Estos resultados sugieren que el canal de sodio se vuelve insensible al fármaco dando una explicación al fenómeno de refractariedad.

Además de los canales de sodio, los receptores de tipo ionotrópico de GABA (receptor GABA_A) son blancos terapéuticos importantes ya que regulan la respuesta inhibitoria rápida, por lo que una alteración en su estructura puede llevar a diversas patologías neurológicas y psiquiátricas como la epilepsia (Schmidt y Löscher, 2005). El fármaco o ligando es reconocido por su receptor o blanco terapéutico lo que permite el acoplamiento correcto entre ambos (figura 2A). En un tejido cerebral

epileptogénico, el receptor (figura 2B) ha sufrido modificaciones estructurales en el sitio de unión al ligando lo que no permite un acoplamiento adecuado a pesar de que existe un reconocimiento o de que no se realice la unión receptor-ligando (Remy y Beck, 2006). Lo anterior, probablemente genera la inactivación del receptor y la interrupción de la cascada de señalización hacia el interior de la neurona, lo cual evita una respuesta fisiológica neuronal y no se obtiene el efecto terapéutico deseado.

b) Teoría del transportador multi-fármacos.

La farmacodinamia; así como, la farmacocinética están involucradas en la fármacorresistencia, por lo que se han establecido dos corrientes dentro de la farmacocinética que fundamentan la teoría del transportador multi-fármacos. La primer línea de investigación plantea la sobre expresión del transportador ABC, destacando la participación de la glicoproteína P, y la otra línea de investigación plantea la participación de las proteínas transportadoras asociadas a la resistencia a multi-fármacos (MRP's). Estas proteínas se expresan en la barrera hematoencefálica (BHE) y en la barrera del fluido cerebro-espinal/líquido cefalo-raquídeo que en conjunto regulan el flujo de moléculas al interior del cerebro (Schmidt y Löscher, 2005; Löscher y Schmidt, 2001) ya que actúan como bombas de eflujo. La BHE es una barrera selectiva que solo permite el paso de sustancias altamente lipofílicas como muchos antiepilépticos por difusión simple al interior del cerebro (figura 2C, flechas continuas). Como un mecanismo de defensa, la BHE expresan los

transportadores de multi-fármacos (MDT's) como la glicoproteína P y los MRP's que se expresan en las células endoteliales y actúan como bombas de eflujo, recogiendo el fármaco del espacio intersticial para introducirlo de nuevo al torrente sanguíneo (flechas discontinuas) controlando así la concentración de sustancias en el cerebro. En el cerebro epileptogénico con refractariedad, se observa una mayor expresión de las proteínas MDT's en las células endoteliales lo cual evita que el fármaco llegue a su blanco terapéutico generando un inadecuado control de las crisis epilépticas.

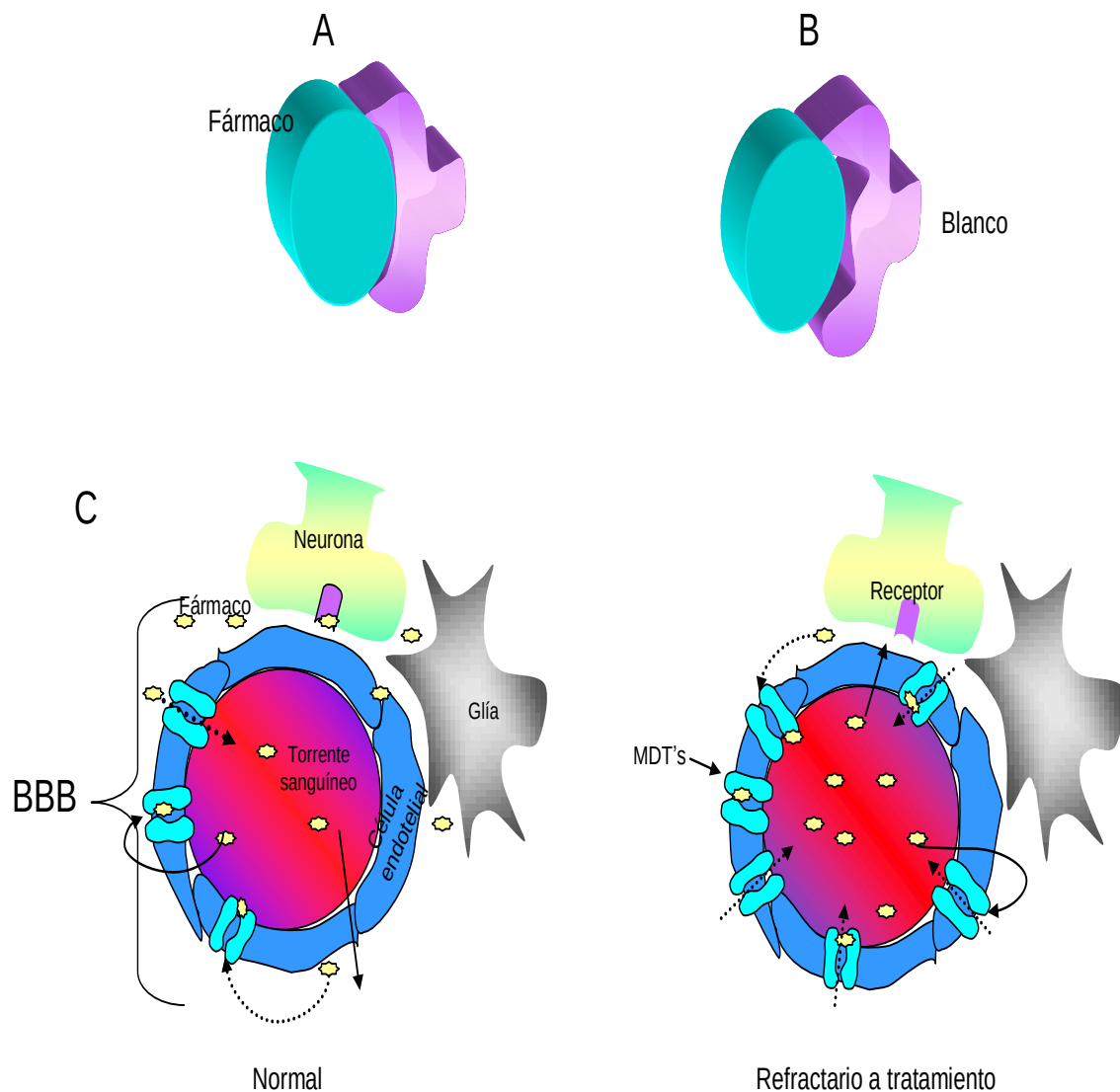


Figura 2. Representación esquemática de las teorías de los mecanismos de refractariedad en ELT (basados en Remy y Beck, 2006). A y B) hipótesis de los blancos terapéuticos. C) hipótesis del transportador multi-fármacos. BHE: barrera hematoencefálica; MDT's: transportadores de multi-fármacos; MRP's: proteínas asociadas a la resistencia a multi-fármacos.

III. Neurotransmisión GABAérgica

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro que es sintetizado en las neuronas GABAérgicas, las cuales representan del 20 ó 40% del total de neuronas en corteza cerebral y en cerebelo. GABA es, liberado aproximadamente en el 40% de todas las sinapsis, ejerciendo su acción inhibitoria prácticamente en todas las regiones del SNC como los ganglios basales, estriado, globo pálido y sustancia negra, el cerebelo, el hipocampo, la corteza cerebral, el bulbo olfatorio, la retina y la médula espinal (Wu, 1985) ejerciendo un control casi total de la excitabilidad neuronal (figura 3).

En el adulto, GABA controla la propagación de la actividad excitatoria del cerebro, al regular el grado de sincronía de las descargas neuronales, lo cual es confirmado por 2 líneas de investigación. La primera demuestra que la reducción de la neurotransmisión GABAérgica conduce a la hiperexcitabilidad neuronal y a la generación de crisis convulsivas, mientras que la segunda línea demuestra que al elevar la neurotransmisión GABAérgica se contrarresta la hiperexcitabilidad (McNamara, 1992).

Para estudiar el papel del sistema GABAérgico en la epilepsia se han desarrollado numerosos modelos experimentales haciendo uso de moléculas antagonistas de GABA como pentilenetetrazol que reduce o bloquea la unión al receptor produciendo descargas epileptiformes, así como agentes convulsionantes

(ácido kaínico y pilocarpina), que producen una fase aguda de estado epiléptico, seguida de una fase libre de crisis que semanas más tarde presentan crisis epilépticas espontáneas recurrentes (Ben-Ari, 1985; Turski, 1983 y Contreras, 2000). Debido a un incremento en la actividad excitatoria en estos modelos se han podido observado cambios en las características electrofisiológicas de las neuronas inhibitorias, modificaciones en la liberación de GABA de las terminales sinápticas como consecuencia de alteraciones en su síntesis, pérdida de neuronas GABAérgicas debido a la intensa actividad excitatoria consecuencia de los efectos convulsivantes de los antagonistas a GABA (Tasker y Dudek, 1991; Treiman, 2001; Wong, 2003). Sin embargo, si se administran agonistas de GABA como las benzodiazepinas se puede revertir el mal funcionamiento del receptor, potenciando el efecto inhibitor de GABA en el SNC lo cual en algunos casos previene o retarda la epileptogénesis (Inoue, 1992).

Para que GABA lleve acabo su función inhibitoria normal es necesario que se den algunos procesos como lo son: síntesis de GABA, liberación y activación de receptores, así como un sistema de recaptura que le permita mantener la homeostasis en la neurotransmisión del SNC.

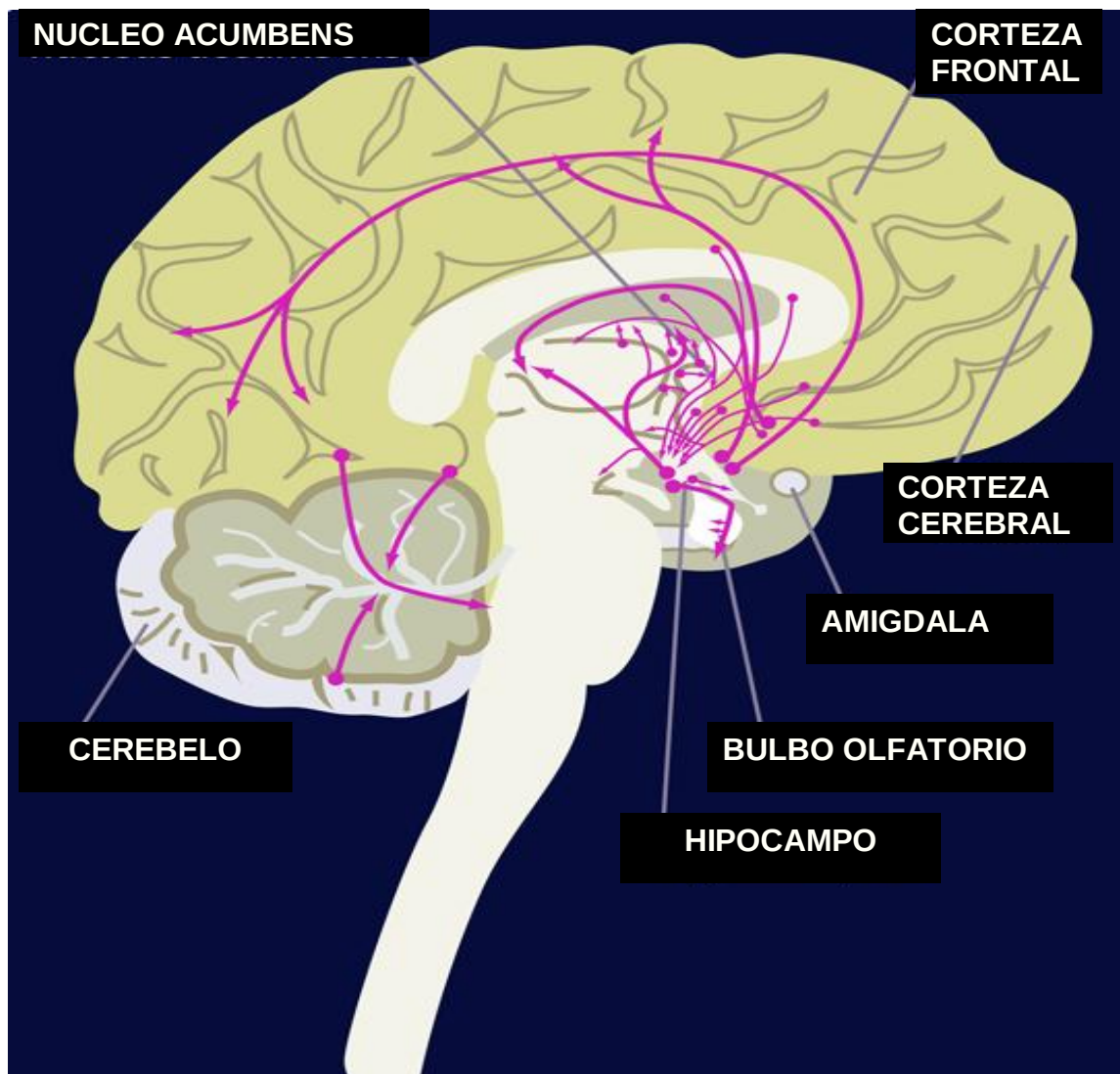


Figura 3. Esquema representativo de la neurotransmisión GABAérgica en el cerebro. Las neuronas GABAérgicas se encuentran distribuidas en casi todo el cerebro, pero su mayor concentración está en el cerebelo, seguida de regiones límbicas como el bulbo olfatorio que liberan GABA al tálamo e hipotálamo, el hipocampo, el núcleo acumbens, la amígdala y la corteza cerebral sobre todo en la cuarta capa (basados en Flores y Pazos, 2004).

III.1. Síntesis del ácido γ - aminobutírico (GABA).

La síntesis de GABA (figura 4) es una α -descarboxilación del ácido glutámico regulada por la enzima ácido glutámico descarboxilasa o GAD (EC 4.1.1.15). Este es un proceso dependiente de fosfato de piridoxal (PLP). El GABA sintetizado es almacenado en vesículas para luego ser liberado al espacio intersináptico por la acción de estímulos nerviosos (Wu, 1985; Martin y Rinvall, 1993). El precursor de este neurotransmisor es el ácido glutámico sintetizado principalmente durante el ciclo de Krebs y del cual entre un 10 y un 40% proviene del metabolismo total de GABA, proceso conocido como desviación de GABA (figura 4). Este proceso es un ciclo cerrado con el propósito dual de producir y conservar el suministro de GABA. El primer paso en la desviación de GABA es la transaminación de α -cetoglutarato, sintetizado a partir del metabolismo de la glucosa en el ciclo de Krebs, por la GABA transaminasa (GABA-T) a ácido glutámico. Por otro lado, la GABA-T también metaboliza a GABA para formar al semialdehído succínico, con la finalidad de conservar el suministro disponible de GABA cuando el α cetoglutarato está disponible para aceptar al grupo amino de GABA y sintetizar paralelamente al ácido glutámico. El semialdehído succínico puede ser oxidado por la semialdehído succínico deshidrogenasa en ácido succínico, el cual puede volver a entrar al ciclo de Krebs e iniciar de nuevo el ciclo para la síntesis del ácido glutámico (Olson y DeLorey, 1999). Existen otras vías alternativas para la formación de GABA, como la reducción del semialdehído succínico a ácido gamma-hidroxibutírico (GHBA), y la transformación de GABA en GHBA y de GHBA en GABA.

Con respecto a las características de GAD, tanto en humanos como en ratas se han encontrado dos isoformas o isoenzimas diferentes de GAD, una con un peso molecular de 65 kDa (GAD-65) y otra con un peso molecular de 67 kDa (GAD-67), codificado por distintos genes. En humanos, el gen de GAD-65 se localiza en el cromosoma 10 mientras que el gen de GAD-67 se encuentra en el cromosoma 2 (Erlander, 1991). Estas dos isoformas difieren en su interacción con la coenzima PLP así como en su localización intraneuronal predominante (Erlander, 1991). Análisis inmunohistoquímicos han demostrado que GAD-65 se localiza cerca de las vesículas sinápticas neuronales mientras que GAD-67 es una proteína citosólica soluble (Kaufman y cols., 1991), lo que sugiere que GAD-65 pueda ser particularmente importante para el control local de la síntesis de GABA en sitios sinápticos mientras que GAD-67 puede ser responsable para mantener los niveles basales de GABA, ya que en el cerebro GAD-67 es responsable de la síntesis de más del 90% de GABA (Martin y Rimvall, 1993). Después de GAD, la enzima GABA transaminasa (GABA-T) es la más importante de las enzimas que intervienen en el metabolismo de GABA, presentando una amplia distribución, tanto en estructuras centrales como periféricas, lo que garantiza una inactivación del GABA rápida y eficiente, de ahí que se utilicen fármacos que bloqueen su actividad enzimática.

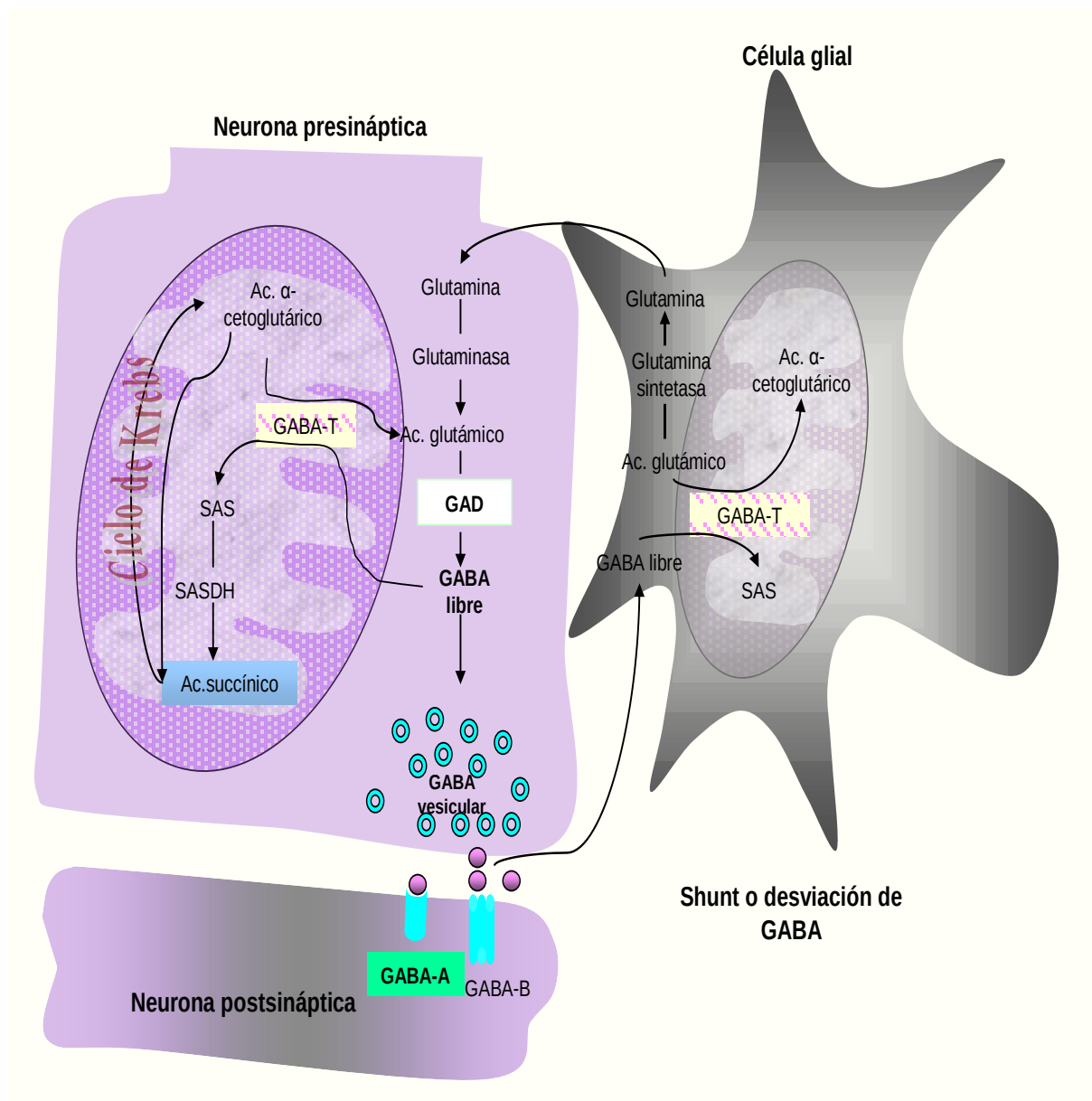


Figura. 4. Metabolismo de GABA (modificado de Mc Geer y Mc Geer, 1989). GABA: ácido (γ aminobutírico; GABA-T: GABA-transaminasa; GAD: ácido glutámico descarboxilasa; SAS: semialdehído succínico; SASDH: SAS-deshidrogenasa; GABA-A: receptor GABAA; GABA-B: receptor GABAB.

III.2. Receptor de GABA_A.

Los efectos neuronales de GABA son mediados por su interacción con receptores específicos, de los cuales el principal receptor es GABA_A. El receptor GABA_A es un receptor ionotrópico y determina la respuesta inhibitoria rápida en la mayoría de las regiones del sistema nervioso central, (Bormann, 1988).

El receptor GABA_A (figura 5) tiene una estructura pentamérica formada por la combinación de diferentes tipos de subunidades, como lo son α (alfa), β (beta), γ (gamma), δ (delta), ϵ (épsilon), θ (theta), π (pi) y ρ (rho). Esta estructura forma un canal permeable al cloro (Cl⁻) el cual permite restablecer el potencial de membrana mediante el flujo de Cl⁻ del exterior al interior de la célula, proceso que es activado cuando GABA es reconocido por su sitio de unión en el receptor. Este receptor que permite la unión a GABA, también presenta sitios de reconocimiento a diferentes compuestos como las benzodiazepinas, barbitúricos, esteroides neuroactivos, picrotoxinas, etanol y anestésicos (Burò y Kamatchi, 1991; Sieghart, 2000). Estos compuestos no interactúan directamente con el sitio de unión a GABA, sino que se unen a sitios alostéricos del receptor, modulando en la mayoría de los casos la unión de GABA a su sitio de unión (Sieghart, 2000).

La estructura más común del receptor GABA_A (figura 5) en el cerebro, la forman 2 subunidades, que a su vez se presenta como 6 isoformas (α 1, α 2, α 3, α 4, α 5 y α 6), 2 subunidades β que se presentan como 3 isoformas (β 1, β 2S, β 2L y β 3) y

una subunidad γ que se presenta como 3 isoformas ($\gamma 1$, $\gamma 2S$, $\gamma 2L$ y $\gamma 3$) (Burò D. y Kamatchi G. 1991). Esta diversidad de isoformas y sus diferentes combinaciones permiten el ensamblaje de receptores con distintas propiedades como afinidad por GABA, modulación alostérica, interacción con proteínas intracelulares, probabilidad de apertura del canal, cinética y conductancia, lo cual redundaría en un incremento considerable de la flexibilidad funcional, por lo que, ciertos cambios en la composición de los receptores parecen afectar el buen funcionamiento de la neurotransmisión GABAérgica (Wang y Buzsaki, 1996).

Cada una de las subunidades juega un papel importante no solo para el correcto ensamblado del receptor sino que también en su funcionamiento farmacológico. La subunidad α juega un papel importante en la fisio-farmacología del receptor, es la subunidad donde se localiza el sitio de unión de GABA, así como el sitio de unión del principal antagonista de GABA picotroxina (figura 5). Además, participa en la formación de los diferentes sitios alostéricos del receptor (Sieghart y Sperk, 2002). La subunidad β es el principal componente de los sitios alostéricos para barbitúricos, esteroides y etanol, mientras que la subunidad γ es el principal componente del sitio alostérico para las BZD (figura 5), que tiene un sitio de alta afinidad y uno de baja afinidad (Dawson y cols., 2005). El sitio de alta afinidad está conformado por la interacción de las isoformas $\alpha 1\beta\gamma 2$, mientras que el sitio de baja afinidad puede presentar varias conformaciones: $\alpha 2\beta\gamma 2$, $\alpha 3\beta\gamma 2$ y $\alpha 5\beta\gamma 2$, siendo la subunidad alfa la que determina el tipo de receptor a BDZ, lo que permite mayor afinidad del GABA por sus sitios de acción, lo cual se traduce en un aumento de la

frecuencia en la apertura del canal de cloro y en un incremento en la neurotransmisión GABAérgica (Upton y Blackburn, 1997).

A pesar de conocer el funcionamiento de GABA y las consecuencias que generan su alteración, se conoce poco sobre la influencia que tiene en la fisiopatogénesis de la epilepsia, sus bases moleculares y celulares. De hecho, su principal aplicación es como estrategia farmacológica en el control de los síntomas mediante el uso de DAEs que ejercen su acción sobre los canales de sodio y calcio y principalmente aquellos que potencian la función GABAérgica. Entre estos últimos tenemos a los barbitúricos que permiten la abertura del canal de cloro y facilitan la acción de GABA (Aparicio-Meix, 1998). Otros agonistas de GABA como son los DAEs pertenecientes a la familia de las BDZ (oxcarbamazepina, clonacepan) que modulan el flujo de cloro inducido por GABA al aumentar la unión de GABA al receptor.

Otros tipos de fármacos que potencian GABA pero que no lo hacen a través de su receptor son el valproato, aunque su mecanismo de acción no se conoce del todo, se sabe que un aumento en la concentración del fármaco facilita la síntesis GABA e inhibe su degradación (Aparicio-Meix, 1998). Vigabitrina, un análogo estructural de GABA, actúa inhibiendo de forma selectiva e irreversible GABA-T, lo que permite generar la suficiente cantidad de GABA presináptico para ser liberado en las sinapsis del SNC. Gabapentina es un análogo de GABA que no posee un efecto mimético directo de GABA, pero posiblemente ejerce algún efecto sobre su síntesis a nivel de GAD y durante liberación de GABA. Tiagabina un potente y

específico inhibidor de la recaptura de GABA, inhibe al transportador de GABA 1 de las membranas sinaptosómicas (GAT-1) o al transportador de GABA 3 (GAT-3) de las células gliales , lo cual permite mantener altas concentraciones de GABA en el espacio intersináptico (Meldrum y Chapman, 1999).

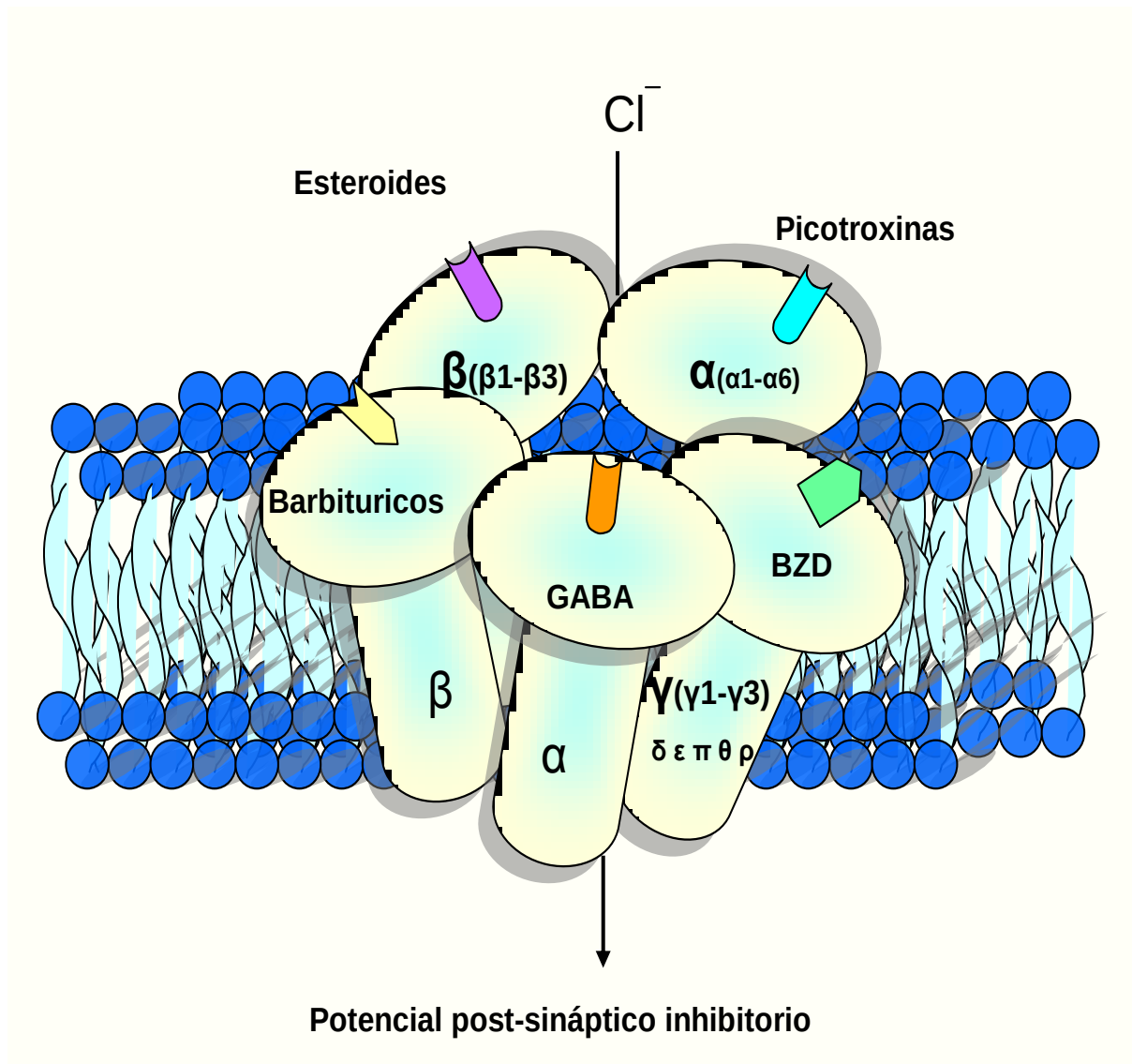


Figura 5. Receptor ionotrópico GABA_A. α: subunidad alfa; β subunidad beta; γ: subunidad gamma; δ: subunidad delta; ε: subunidad epsilon; π: subunidad phi; θ: subunidad theta; ρ: subunidad rho; BZD: benzodiazepinas; Cl⁻: ión cloro

III.3. Transportadores de GABA (GAT).

El GABA que es liberado de la interneurona presináptica, difunde a la hendidura sináptica donde es reconocido por su receptor localizado en la neurona postsináptica. Esta unión altera tanto la permeabilidad iónica como la excitabilidad eléctrica de la membrana, lo que se traduce en una señal que inhibe la hiperexcitabilidad neuronal. Inmediatamente, el neurotransmisor es liberado al espacio extracelular donde es removido rápidamente por un sistema de recaptura, compuesto de moléculas transportadoras de GABA (GAT). Estos transportadores modulan indirectamente la neurotransmisión, mantienen los niveles basales y previenen que se alcancen niveles tóxicos extracelulares (Millar, 1997).

Basados en estudios moleculares y bioquímicos, se han podido caracterizar 4 proteínas de membrana que actúan como transportador de GABA tanto en rata, ratón y en el humano con una homología del 99% (Borden, 1996). El grupo de moléculas transportadoras de GABA en el humano se conforman de cuatro proteínas llamadas GAT-1, GAT-2, GAT-3 y un cuarto transportador conocido como transportador de GABA/betaina (BGT-1). Sin embargo, solo los transportadores GAT-1 y GAT-3 se expresan en el SNC, los cuales fueron identificados por inmunoreactividad y microscopia de luz, por lo que ambos tienen una relevancia importante en la epilepsia. GAT-1, se expresa en neuronas presinápticas GABAérgicas mientras que GAT-3 se expresa exclusivamente en glía, principalmente astrogliá (Radian y cols., 1990; Ribak y cols., 1996). GAT-2 y BGT-1

son expresados en tejidos periféricos principalmente, aunque últimamente se ha detectado mediante hibridación in situ la presencia de GAT-2 en el sistema nervioso central pero cuando se ha intentado localizar por inmunohistoquímica los resultados no han sido favorables (Conti y cols., 2004).

La recaptación neuronal por parte de GAT-1, es pequeña pero muy importante, ya que el GABA recapturado puede liberarse de nuevo o bien ser almacenado para mantener la poza de GABA en la interneurona presináptica. Por el contrario, el GABA capturado por GAT-3 localizado en glía es degradado por la GABA-T para posteriormente entrar al ciclo de Krebs y sintetizar ácido glutámico el cual es transportado a la interneurona para servir como precursor de GABA (Olson y DeLorey, 1999).

La expresión y función de los transportadores en diferentes tipos de epilepsia parecen estar modificados por la participación de algunas drogas, particularmente aquellas que actúan sobre monoaminas como tiagabina (TTGB) e imipramina, pueden alterar o modificar la expresión de los transportadores de GABA contribuyendo así a mantener la funcionalidad normal de la neurotransmisión GABAérgica (Lai, 1998).

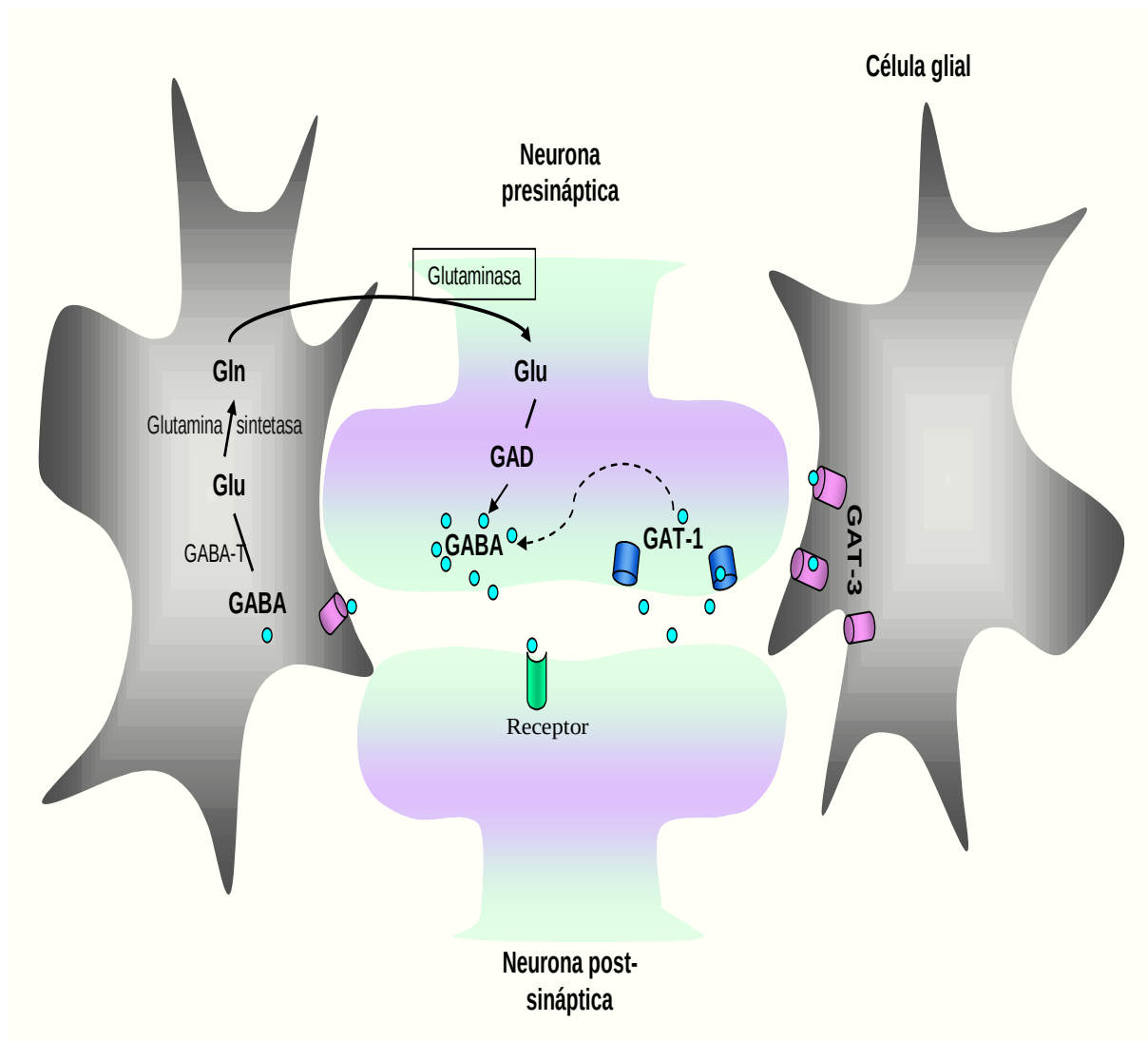


Figura 6. Sistema de recaptura de GABA en la hendidura sináptica (basados en Conti y cols., 2004). Glu: glutamato; Gln: glutamina; GABA-T: GABA transaminasa; GAD: ácido glutámico descarboxilasa; GAT-1: transportador de GABA 1; GAT-3: ● transportador de GABA 3. GABA.

IV. Antecedentes.

Estudios en pacientes con epilepsia muestran alteraciones en la concentración del GABA extracelular lo cual puede estar relacionado con las funciones de los transportadores. Por ejemplo, estudios de microdiálisis en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, mostraron un incremento en la concentración de glutamato en las etapas ictal y posictal, mientras que las concentraciones del GABA extracelular se encuentran disminuidas considerablemente, esto con respecto a las concentraciones observadas en los pacientes no epilépticos (Thomas y cols, 2004 y 2005), por otro lado los estudios electrofisiológicos realizados en rebanadas de hipocampo que fueron obtenidas de pacientes con ERTRAFAR mostraron una disminución en la actividad de los transportadores (Williamson y cols., 1995). Hirao y cols., (1998), mediante hibridación in situ, investigaron el papel de los transportadores GAT-1 y GAT-3 en la amígdala e hipocampo de ratas cuya inducción de la epilepsia fue por aplicación de pulsos eléctricos (kindled). En el hipocampo observaron un incremento en la expresión del RNAm de GAT-1 mientras que el RNAm de GAT-3 mostró mayor expresión en amígdala y todos estos cambios en la expresión del RNAm de ambos transportadores, retornaron a su nivel basal en un lapso de entre 8 a 24 horas después de ser estimuladas. Sperk y cols. (2003), en un modelo de ELT en ratas inducido con ácido kaínico, midieron los niveles de expresión de RNAm de GAT-1 y GAT-3. Ellos demostraron que 4 horas después de la inducción de las crisis epiléptica, el RNAm de GAT-1 aumentaba transitoriamente

en un 30 %; pero el RNAm de GAT-3 disminuyó de 25 a 75%, con respecto a los niveles encontrados en los animales controles.

El receptor GABA_A se encuentra ampliamente distribuido en el SNC, el cual es el generador de la respuesta inhibitoria rápida y ha sido objeto de numerosos estudios, con el fin de analizar su estructura pentamérica y su relación con la patogénesis de la epilepsia. Los estudios funcionales y moleculares en modelos de ratas con ELT insensibles a tratamiento indican cambios transcripcionales en la composición del receptor. En un modelo de epilepsia inducido por ácido kaínico se analizaron los niveles de expresión del RNA mensajero (RNAm) de las subunidades del receptor GABA_A, mostrando que las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 3$ y γ disminuían su expresión, mientras que la subunidad $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\beta 2$ aumentaron su nivel de expresión, sin embargo la subunidad $\alpha 6$ se mantuvo constante (Tsunashima y cols., en 1998)

Por otro lado, estudios en tejidos resecados de pacientes con esclerosis hipocámpal los cuales se compararon con tejidos que no presentaban esclerosis hipocámpal se observó una disminución en la expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\beta 3$ y $\gamma 2$ en la región CA1 en tejido esclerótico mientras que la subunidad $\beta 2$ presentaba un fuerte incremento (Pirker y cols., 2003). Estos antecedentes sugieren, que la ERTRAFAR, puede ser causada por la alteración en la expresión del RNAm de cada uno de los componentes de la neurotransmisión GABA. Sin embargo, no se han estudiado los cambios en la expresión de cada uno de los componentes de la

neurotransmisión GABAérgicas (GAD-67, subunidades del receptor y los transportadores) en tejido hipocampal completo así como, en la zona de propagación (corteza cerebral).

V. Justificación.

A pesar del advenimiento de nuevas DAEs y del progreso en el entendimiento de la patogénesis de las crisis epilépticas, el problema de las convulsiones intratables prácticamente no ha cambiado, ya que una tercera parte de pacientes continúa con crisis epilépticas, a pesar del uso de dos o más DAEs y un monitoreo adecuado de los niveles séricos de los medicamentos. Lo anterior, influye en el incremento de la morbi-mortalidad, en el costo económico (en adultos incapacidades y pensiones; en niños y adultos, el costo de los medicamentos y de los estudios de control y seguimiento aumentan); en lo social, especialmente en niños genera un deterioro mental progresivo que los hace incapaces de relacionarse con su entorno. Aunque se sabe que el tratamiento quirúrgico no siempre es curativo, la resección del foco epiléptico o la interrupción de sus vías de diseminación, mejoran la frecuencia, la intensidad, y la duración de las crisis, y pueden disminuir el número y dosificación de las DAEs, mejorando la calidad de vida.

Debido a que el principal obstáculo para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento para la ERTRAFAR, es el pobre conocimiento de los mecanismos que la producen, se propone estudiar el hipocampo y la corteza temporal resecados de pacientes con ERTRAFAR, buscando identificar algunos de los mecanismos que en modelos experimentales han demostrado alteraciones. La neurotransmisión inhibitoria mediada por GABA constituye el principal sistema de control para sincronizar las descargas neuronales y mantener el balance entre la excitación y la

inhibición. El entendimiento de las modificaciones moleculares en este tipo de neurotransmisión, nos indicaría la falta de respuesta a los fármacos en pacientes con ERTRAFAR, y permitiría ensayar alternativas terapéuticas en beneficio de los pacientes.

VI. Planteamiento del problema.

La neurotransmisión inhibitoria mediada por GABA constituye el principal sistema de control para la sincronía de las descargas neuronales y el mantenimiento del balance entre la excitación y la inhibición. Así las modificaciones en la neurotransmisión GABAérgica puede producir crisis incontroladas. Dado que la gran mayoría de las DAEs, actúan sobre la neurotransmisión GABAérgica potenciando su funcionamiento, en muchos de los casos pueden modificar el patrón de las crisis epilépticas, y en el mejor de los casos controlarlas, de tal forma que si la epilepsia produce modificaciones en la neurotransmisión GABAérgica, en la ERTRAFAR, probablemente estas modificaciones se deban a una disminución en los niveles de expresión del RNAm tanto de la GAD, del receptor GABA_A y de su transportador, en el tejido cerebral de pacientes con ERTRAFAR, por consiguiente estas modificaciones alteraran los sitios de unión de los ligandos al receptor GABA_A, en el tejido cerebral de pacientes con ERTRAFAR, en comparación a los no epilépticos, sometidos todos a cirugía resectiva.

VII. Hipótesis.

La ERTRAFAR en humanos produce disminución en la expresión del RNAm tanto de la GAD 67, de las subunidades del receptor GABA_A, así como de sus transportadores en el hipocampo y corteza temporal.

VIII. Objetivos.

VIII.1. Objetivo General

Conocer las alteraciones en la expresión del RNAm de GAD-67, de las subunidades del receptor GABA_A, así como de sus transportadores GAT-1 y GAT-3, en hipocampo y corteza temporal de pacientes con ERTRAFAR.

VIII.2.- Objetivos específicos.

Evaluar los niveles de expresión del RNAm de la enzima GAD 67 en tejido de pacientes con ERTRAFAR en hipocampo y corteza temporal.

Medir los niveles de expresión del RNAm de los principales transportadores vesicular y no vesiculares de GABA, GAT-1 y GAT-3 en tejido de pacientes con ERTRAFAR en hipocampo y corteza temporal.

Cuantificar la expresión del RNAm de la subunidad α , γ y β así como de cada una de sus isoformas del receptor GABA_A en tejido de pacientes con ERTRAFAR en hipocampo y corteza temporal.

IX. Protocolo experimental.

IX.1. Diseño experimental

Estudio transversal, de causalidad y comparativo

IX.2. Obtención de la muestra.

Población objetivo: Pacientes con ERTRAFAR, con un foco epiléptico demostrable y susceptible de tratamiento quirúrgico, procedimiento que realizó el servicio de Neurocirugía como alternativa de control de las crisis, el comité de cirugía de epilepsia decidió que pacientes eran candidatos a cirugía, independientemente de este estudio.

Muestra: Tejido obtenido de pacientes con ERTRAFAR que acuden a la consulta de la Clínica de Epilepsia del Departamento de Neurología y Neurocirugía del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN). Las áreas evaluadas fueron el foco (hipocampo) y el área de propagación (corteza temporal (T1-T3). El neurocirujano es quien obtuvo la muestra de aproximadamente 1-2 mm de la región temporal, la cual se congeló en nitrógeno líquido dentro de 1 vial estéril, libre de RNAasas y con 250 microlitros de RNAlater.

Se identificó a los pacientes con diagnóstico de epilepsia del lóbulo temporal y refractarios a tratamiento farmacológico y se les comparó con un grupo que no

presentó este padecimiento (controles). Nos referimos a pacientes, sin embargo, la comparación fue tejido con ELT y tejido sano. Ya que los individuos fueron seleccionados en función de la presencia o ausencia del evento de estudio y no por su exposición.

IX.3. Criterios de selección.

- 1). Pacientes referidos a los Departamentos de Neurología Adultos
- 2) 16 años a 60 años
- 3) Ambos géneros
- 4) Diagnóstico de epilepsia (ELT) refractaria al tratamiento farmacológico, incluyendo a las crisis de patrón mixto (parciales de semiología compleja y/o atónicas, tónico clónico generalizadas)
- 6) Con exámenes de laboratorio dentro de la normalidad (biometría hemática completa, química sanguínea, electrolitos y niveles séricos de medicamentos anticonvulsivantes), y pruebas de función hepática no mayores al doble de los niveles máximos normales.
- 7) Que acepten ingresar al proyecto después de una reunión informativa y firma de carta de consentimiento.

Criterios de Inclusión.

- 1) Pacientes de entre 20-60 años.
- 2) Sexo indistinto
- 3) Tipo de epilepsia

Epilepsia del Lóbulo Temporal con esclerosis Hipocampal

Criterios de no inclusión

- 1) Pacientes con discrasias sanguíneas
- 2) Con anticoagulantes
- 3) Todos aquellos que no aceptarán ingresar al protocolo
- 4) Epilepsias extratemporales

Criterios de exclusión

- 1) Cuando el paciente así lo solicite.

IX.4. Extracción de RNA total.

La extracción de RNA se realizó con el reactivo TriPure Isolation Reagent (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante, como se describe a continuación. 50-100 mg de tejido se homogenizaron con 1.0 mililitros (ml) del reactivo TriPure (Roche), se mantuvo en baño de hielo por 5 minutos para disociar el complejo de nucleoproteínas y se agregó 200 µl de cloroformo frío. El homogenizado se agitó vigorosamente en vortex durante 15 segundos y se incubó en baño de hielo durante 15 min. Transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 12000xg durante 15 min. a 4°C. Se extrajo cuidadosamente el sobrenadante (fase incolora) y se depositó en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml, una vez separada la fase incolora, se le agregó un volumen igual de isopropanol el cual se mezcló por inversión y se incubó durante 24 hrs. a -20° C. Posteriormente, se centrifugó a 12000xg 10 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y la pastilla obtenida se lavó con etanol al 75% preparada en agua libre de nucleasa (Agua grado biología molecular). El lavado con

etanol al 75% consistió en dos ciclos de desprendimiento del precipitado y centrifugación a 7500xg por 5 min. a 4°C. Finalmente, el precipitado se disolvió en agua grado biología molecular (promega) en un volumen de 20 µL. La muestra resuspendida se incubó por 30 min en hielo. Se evaluó la pureza y concentración del extracto a través del índice de absorbancia de la muestra a 260/280 nm (RNA/proteínas) y la lectura a 260 nm, respectivamente. Las muestras se conservaron a -80°C hasta su utilización para la síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario o cDNA.

IX.5. Síntesis de cDNA por retrotranscripción (RT).

3 µg de RNA total diluidos en 6µl de agua, 1µl de cebadores aleatorios (random primers, Promega, USA) y 1µl de deoxinucleótidos (dNTP's, Promega, USA) se incubaron a 65°C por 5 min. Posteriormente se agregaron 1 µl del amortiguador de reacción 10x y 1µl de su enzima RT-MMLV (transcriptasa reversa, New England, Inglaterra) para un volumen final de 10 µl. La reacción se llevó a un termociclador (Bio-Rad, USA) utilizando el siguiente programa: 10 min a 25°C un ciclo, 50 min a 37°C un ciclo y 15 min a 70 min un ciclo. La reacción se almacenó a -70°C, hasta que se realizaron los ensayos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

IX.6. Amplificación de cDNA mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La amplificación de genes se realizó en una mezcla de reacción compuesta por 1 μ l del amortiguador de reacción 10x, 0.2-0.4 μ l de $MgCl_2$ 50mM (ver anexo I). 2 μ l de dioxinucleótidos 10 mM (Promega, USA), 0.2 μ l de cada oligonucleótido específico 10 mM (Invitrogene, USA), 0.2 μ l de Taq DNA polimerasa 5U/ μ l (New England Bio Labs, USA) y 1 μ l cDNA como templado, en un volumen final de 10 μ l. Los oligonucleótidos flanqueantes o primers específicos para cada gen están descritos en el anexo 2. El programa de amplificación (figura 7) fue de 1 ciclo a 94°C por 3 min; 30-35 ciclos de 94°C por 30 seg, 54°- 58°C por 20-30 seg, 72°C por 30-40 seg y un ciclo de extensión final de 10 min a 72°C, utilizando un termociclador (Bio-Rad, USA).

En cada serie de reacciones se incluyó un blanco de reactivos como un control negativo de contaminación. Los productos de amplificación de cada PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2 % preteñidos con Bromuro de etidio (0.6 μ g/ml de gel), a 70 V en amortiguador TAE 1X (tris- acetato 40 mM y EDTA 1mM; pH 7.2). Las bandas de los productos de amplificación se evidenciaron por medio de luz UV y las imágenes se digitalizaron a través de un sistema de análisis y foto documentación de imágenes (Alpha Innotech corporation IS-1000 digital imaging system). El análisis de las bandas se realizó mediante el programa de computo ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Para el análisis de cada banda, se tomó un área constante de 126, que sirvió de base para obtener la densidad integrada (VDI).

X. Análisis estadístico de los resultados.

Se utilizó estadística descriptiva para representar los resultados obtenidos en las escalas correspondientes con cuadros y gráficas en donde se muestren valores totales, medias o medianas y error estándar. Los resultados de los promedios para cada variable, se sometieron a análisis de normalidad. Si la distribución fue normal se realizó la prueba paramétrica ANOVA y una t no pareada. Se consideró un valor de significancia (α) de 0.05. Los datos estadísticamente significativos fueron correlacionados con los datos clínicos de cada paciente (tabla 1), mediante una correlación de Pearson, considerando un valor de significancia de 0.05.

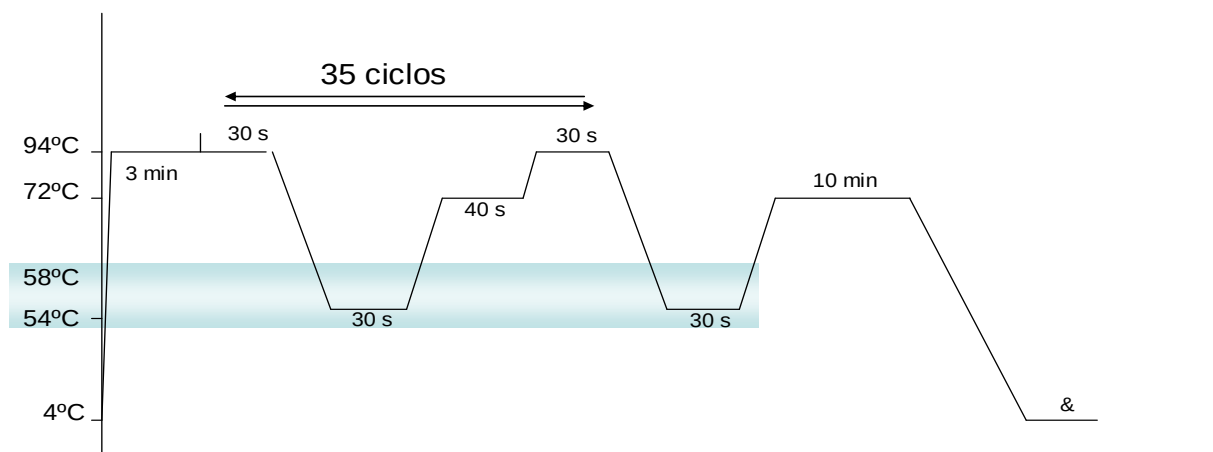
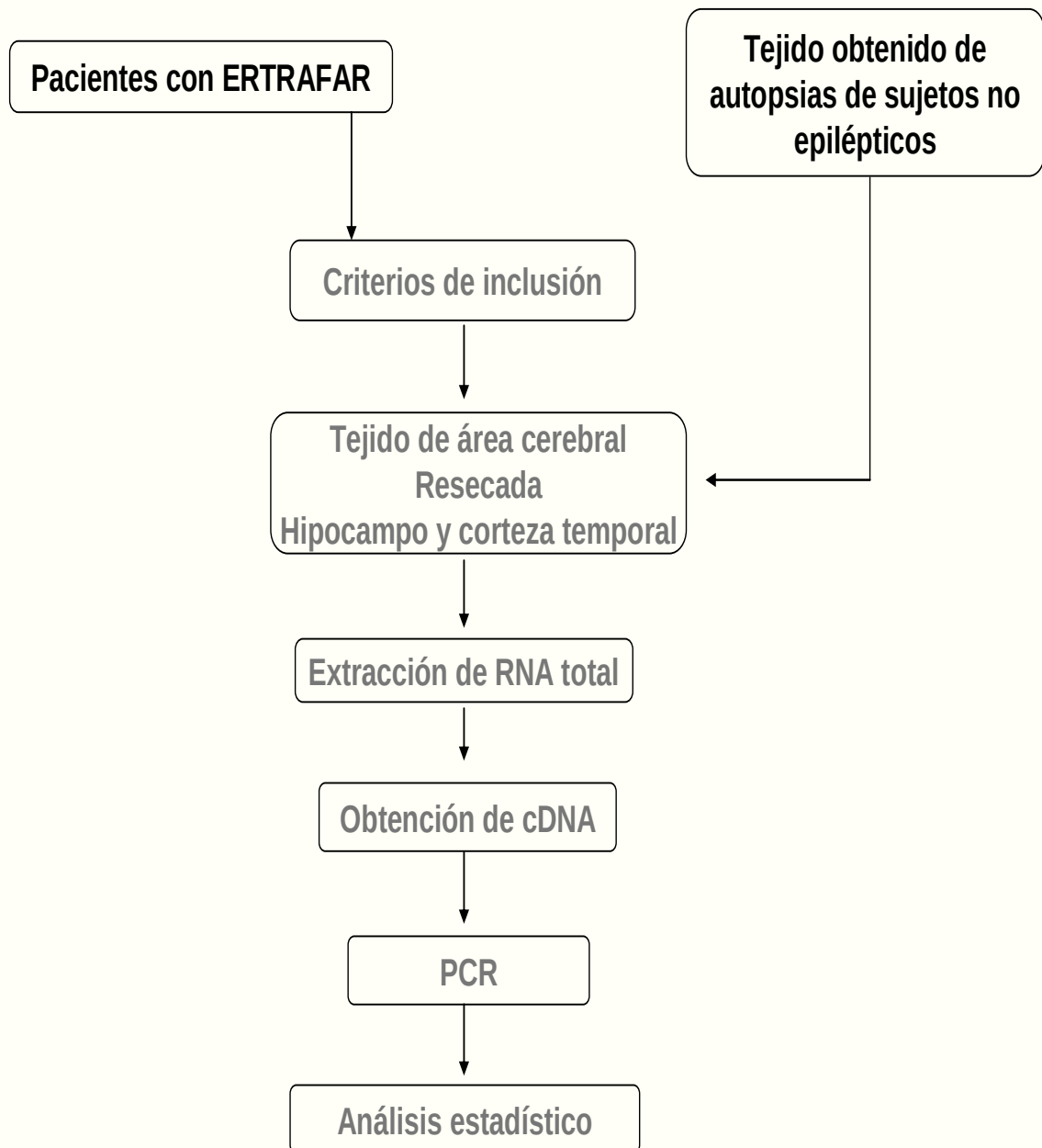


Figura 7. Esquema grafico de las condiciones de amplificación de cada uno de los genes. El rectángulo de color indica el rango de las temperaturas de amplificación para cada uno de los genes.

Diagrama experimental



XI. Resultados.

XI.1. Datos clínicos de los casos analizados.

Los datos clínicos preoperatorios de los casos analizados, se muestran en la tabla 1, donde se incluye la politerapia a la que fue sometido el paciente, el diagnóstico, la edad de inicio de las crisis, el tiempo con las crisis, la edad al momento de la cirugía y el sexo, mientras que en la tabla 2 se presentan los datos de las variables de los dos grupos. Todos los casos analizados fueron sometidos a politerapia con topiramato, trileptal, clonazepan, carbamazepina, primidona, y ácido valproico; en su mayoría encaminados a potenciar la neurotransmisión GABAérgica.

Tabla 1 Datos clínicos de los casos analizados. Los datos se basan en el historial clínico de cada paciente hasta antes de ser sometido a cirugía.

Paciente	Edad	Sexo	1ª crisis	Duración de las crisis	Frecuencia de las crisis (mes)	Fármacos utilizados	Duración del tratamiento	Diagnostico
105663	34 años	F	10 años	24 años	18	CBZ, DFH, PRM, PMD	10 años	Crisis parciales complejas. Esclerosis Mesial temporal izq. Video EEG tipo parcial complejo inicia temporal izq. RMI
174988	31 años	M	8 años	23 años	12	Epamin, Kapra, trileptal, lamictal CBZ	15 años	Crisis parciales complejas. Video EEG, evento octal parcial complejo, con inicio temporal anterior izq. SPECT.
176494	21 años	F	8 años	13 años	4	Topiramato, CBZ, lamotrigina	8 años	Epilepsia del Lóbulo temporal izq. Esclerosis Mesial. RMI
139595	46 años	M	31 años	15 años	4	CBZ, AVP, clonazepan	15 años	Epilepsia del Lóbulo temporal y Esclerosis Mesial izquierda. MRI
183247	45 años	M	17 años	28 años	30	Oxcarbamazepina, topomax, AVP	10 años	Epilepsia del Lóbulo temporal y Esclerosis Mesial izquierda. MRI
141240	37 años	F	3 años	34 años	5	DFH, CBZ, lamictal, AVP	30 años	Epilepsia de difícil control. Esclerosis Mesial Temporal derecha. SPECT
74161	36 años	M	3 años	33 años	6	CBZ, lamotrigina, PMD	10 años	Epilepsia de difícil control. Esclerosis Mesial

166883	23 años	M	5 años	18 años	4	Oxcarbamazepina, topiramato, Lamotrigina	12 años	Epilepsia del lóbulo temporal derecho. Esclerosis Mesial. MRI
57459	58 años	M	2 años	56	4	CBZ, AVP, clonazepan	36 años	Epilepsia del Lóbulo temporal y Esclerosis Mesial izquierda. MRI
177925	22 años	F	5 años	17 años	15	CBZ, AVP, DFH	7 años	Epilepsia del lóbulo temporal derecho. Esclerosis Mesial. MRI
187992	35 años	F	21 años	14 años	6	CBZ, AVP, clonazepan	8 años	Epilepsia del lóbulo temporal derecho. Esclerosis Mesial. MRI
144669	28 años	M	2 años	26 años	8	AVP, CBZ, Lamotrigina	14 años	Epilepsia del lóbulo temporal derecho. Esclerosis Mesial. MRI
290208	36 años	M	3 años	33 años	15	CBZ, lamotrigina, DFH	15 años	Epilepsia de difícil control. Esclerosis Mesial Temporal. MRI
180	37 años	F	3 años	34 años	6	DFH, CBZ, lamictal, AVP	25 años	Epilepsia de difícil control. Esclerosis Mesial Temporal derecha. MRI

Tabla 2. Comparación de las variables clínicas de los dos grupos de pacientes.

	Control	ERTRAFAR
Edad (años $\pm$ SD), rango	47.3	34.9 $\pm$ 10.13 (21- 58)
Inicio de las crisis (años $\pm$ SD), rango	-----	8.6 $\pm$ 8.62 (2-31)
Duración de las crisis (años $\pm$ SD), rango	-----	26.3 $\pm$ 11.57 (13-56)
Frecuencia de las crisis (mes $\pm$ SD) rango		9.78 $\pm$ 7.53 (4-30)
Duración del tratamiento (años $\pm$ SD) rango		15.36 $\pm$ 8.82 (7-36)
M:F	3:1	9:5
Horas de fallecido (años $\pm$ SD) rango	4.0 $\pm$ 0.8165	-----
Der:Izq		8:6
Carbamazepina		12
Oxcarbamazepina		3
Clonazepan		3
Ácido valproico		8
Topiramato		3
Primidona		2

Simbología: M: masculino, F: femenino, Der: temporal derecho Izq: temporal izquierdo, SD: desviación estándar.

XI.2. Expresión de las moléculas transportadoras de GABA (GAT-1 y GAT-3) en tejido hipocampal con ERTRAFAR.

Se evaluaron los niveles de expresión del RNAm de las dos moléculas transportadoras de GABA localizadas en el SNC, (figura 8). La expresión de cada gen fue dividido entre el cociente de la expresión de β -actina, un gen de expresión constitutiva, para su normalización. El RNAm de GAT-1 (figura 8a, 8b) y GAT 3 (figura 8a, 8c) en el tejido con ERTRAFAR, se expresó 0.83 y 0.72 veces más con respecto a β -actina o gen control, mientras que, en el tejido no epiléptico la expresión fue de 0.92 y 0.90 veces la expresión del gen control, respectivamente. Lo anterior indica una disminución de 0.09 y 0.22 veces con respecto a la expresión del RNAm de ambos transportadores en el tejido no epiléptico. Sin embargo, únicamente GAT-3 presento una diferencia significativa ($p \leq 0.04$).

XI.3. Expresión de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD-67) en tejido hipocampal con ERTRAFAR.

Al analizar la expresión del RNAm de la enzima encargada de la síntesis de GABA encontramos que el nivel de expresión en el tejido con ERTRAFAR es 1.6 veces la expresión del gen control, mientras que en el tejido no epiléptico fue de 0.9 (figura 9), lo cual nos da una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.004$) de 0.7 veces más en el tejido con ERTRAFAR que en el control.

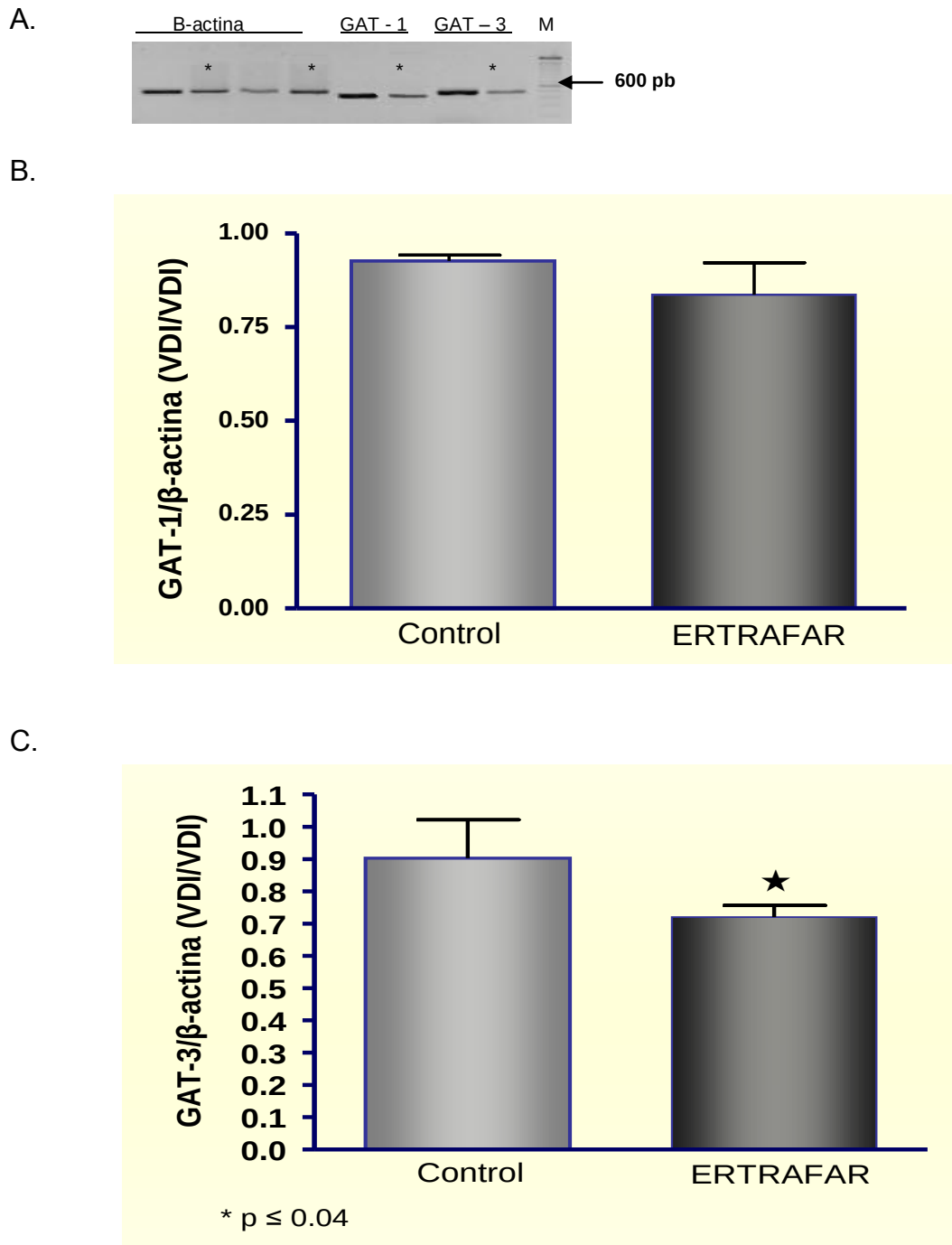


Figura 8. Expresión del RNAm de los transportadores de GABA en hipocampo. A) Gel que muestra la expresión cualitativa del transportador GABA 1 (GAT-1) y el transportador GABA 3 (GAT-3) (Sujetos con ERTRAFAR *; sujetos control sin asterisco). B) Valores medios normalizados de los VDIs de GAT-1 entre el gen control β -actina $\pm$ el error estándar de los pacientes con ERTAFAR y sujetos control. C) Valores medios normalizados de los VDIs de GAT-3 entre el gen control β -actina $\pm$ el error estándar de los pacientes con ERTAFAR y sujetos control. VDI = valor de densidad integrado. t-student $p < 0.05$.

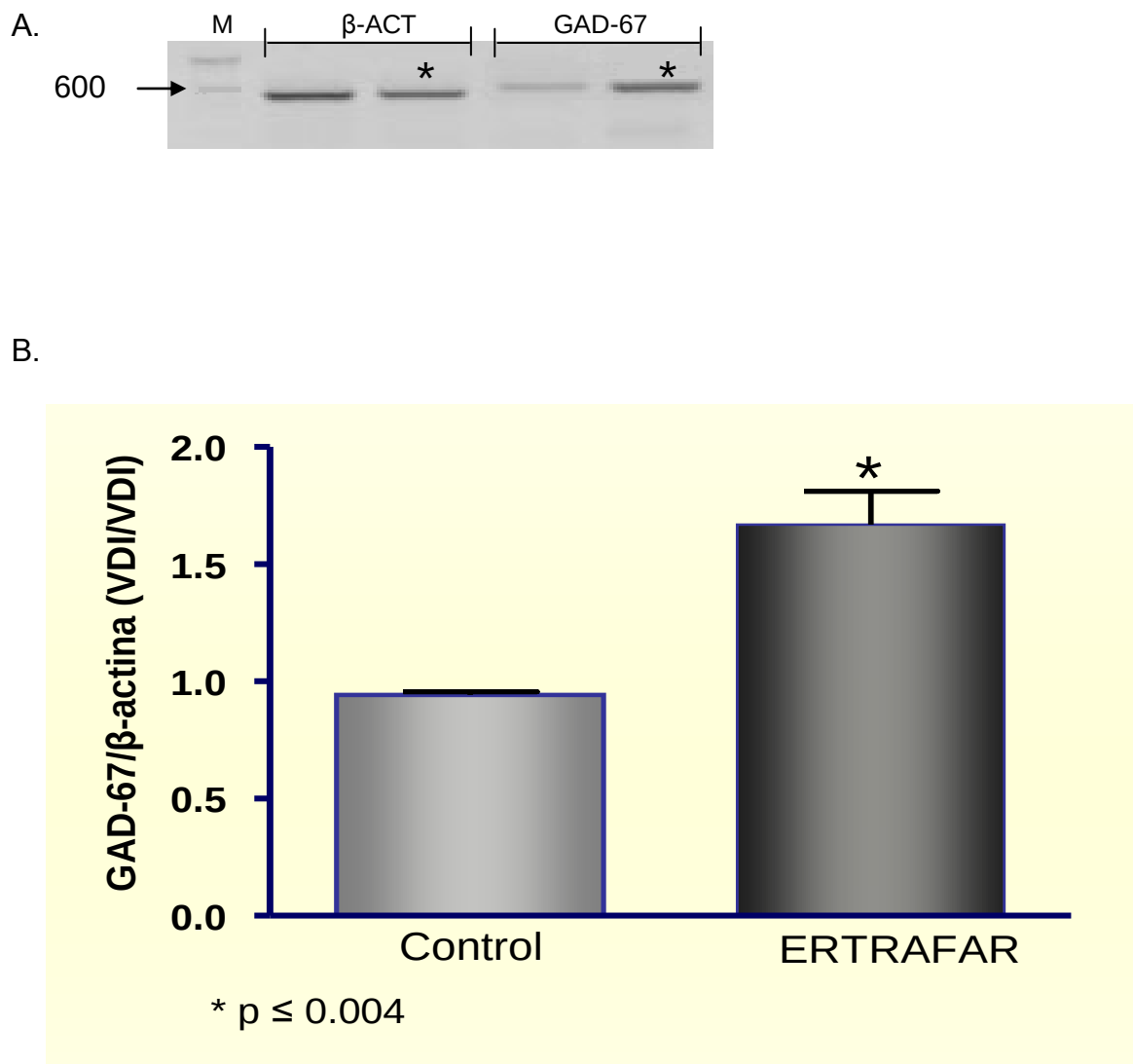


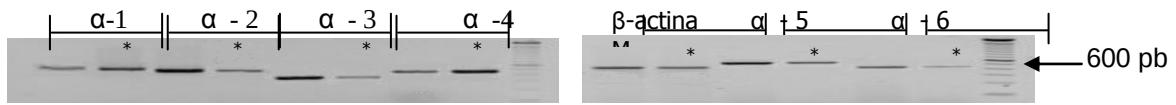
Figura 9. Expresión del RNAm de GAD 67 en hipocampo. A) Gel representativo de la expresión de la enzima Glutamato descarboxilasa (GAD 67) (Sujetos con ERTRAFAR *; sujetos control sin asterisco). B) Valores medios normalizados de los VDIs de GAD-67 entre el gen control β -actina $\pm$ el error estándar de los pacientes con ERTAFAR y sujetos control. VDI = valor de densidad integrado. t-student $p < 0.05$.

XI.4. Expresión de las subunidades del receptor GABA_A en tejido hipocampal con ERTRAFAR.

XI.4.1. Subunidad alfa.

La subunidad alfa del receptor GABA_A presenta seis isoformas deferentes ($\alpha 1$ – $\alpha 6$). La expresión de cada una de las isoformas fue normalizada entre el cociente de la expresión de β -actina, un gen cuya expresión es constitutiva (figura 10). El nivel de expresión de la isoforma alfa 1 en los tejidos con ERTRAFAR es de 2.0 veces mayor a la expresión obtenida de β -actina, mientras que en los tejidos no epilépticos se obtuvo una expresión de 1.3 veces mayor, con una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.003$) en los niveles de expresión de 0.7 entre el tejido hipocampal con ERTRAFAR y el control. Lo que indica un aumento en la expresión del RNAm en el tejido con ERTRAFAR. Un resultado similar se obtuvo con la isoforma 4 cuya diferencia en el nivel de expresión del RNAm en el tejido hipocampal con respecto a la expresión en el tejido no epiléptico es de 0.5, con una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.04$). Las isoformas 2 y 3 presentaron una disminución en los niveles de expresión del RNAm en el hipocampo de pacientes con ERTRAFAR de 0.3 y 0.5 respectivamente comparados con los controles con una $p \leq 0.04$ para alfa 2 y una $p \leq 0.003$ para alfa 3. Mientras que las isoformas 5 y 6, a pesar de mostrar una ligera disminución en la expresión del RNAm de 0.04 para alfa 5 y de 0.06 para alfa 6 con respecto a la expresión en el tejido no epiléptico, no fue estadísticamente significativo (Fig.10).

A)



B.

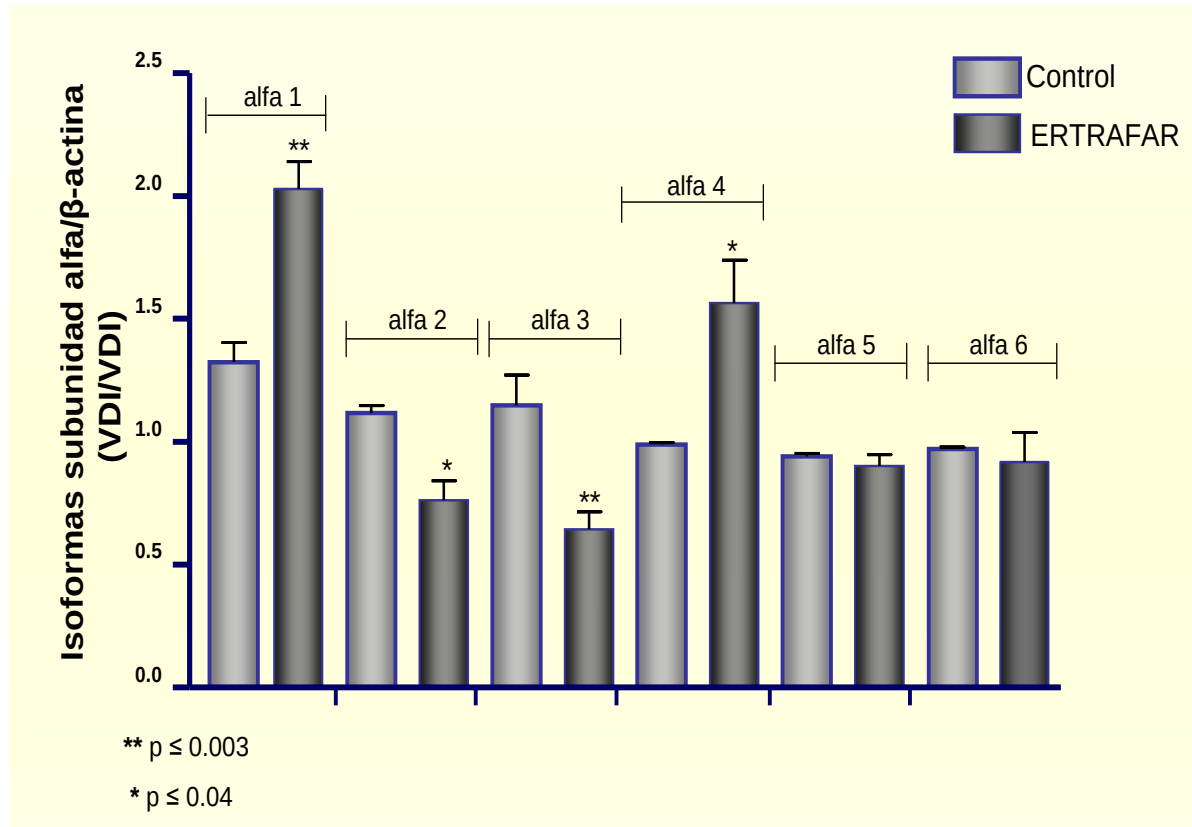


Figura 10. Expresión del RNAm de la subunidad alfa (α) y sus isoformas en tejido hipocampal. A) Geles representativos de las isoformas de la subunidad alfa (Sujetos con ERTRAFAR *; sujetos control sin asterisco). B) Valores medios normalizados de los VDIs de las isoformas de la subunidad alfa entre el gen control β -actina $\pm$ el error estándar de los pacientes con ERTAFAR y sujetos control. VDI = valor de densidad integrado. t-student $p < 0.05$.

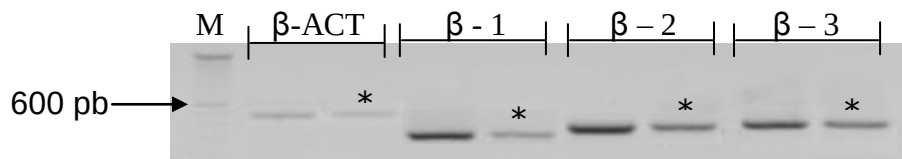
XI.4.2. Subunidad beta

La expresión del RNAm en las 3 isoformas de la subunidad beta del receptor GABA_A mostró una disminución, pero no en todas las isoformas se observó una diferencia estadísticamente significativa (figura 11). Las isoformas 1 y 2 mostraron una $p \leq 0.02$ cuando se cuantificó su expresión en el tejido hipocampal con ERTRAFAR, con niveles de expresión del RNAm de 1.25 y 1.00 veces la expresión de β -actina. En el tejido sin epilepsia, los niveles de expresión fueron 1.80 para beta 1 y 1.28 para beta 2 lo cual indica una diferencia en la expresión entre los tejidos con ERTRAFAR y los tejidos no epilépticos de 0.55 para beta 1 y 0.28 para beta 2. La isoforma 3 no presentó diferencias significativas ($p \leq 0.28$).

XI.4.3. Subunidad gamma.

La subunidad gamma del receptor GABA_A presenta 3 isoformas las cuales fueron evaluadas a nivel de la expresión del RNAm tanto en tejido epiléptico como en tejido sano, lo cual nos permitió observar cambios en la expresión de cada una de las isoformas (figura 12). Los cambios observados en la expresión de las isoformas mostraron disminución en el RNAm de gamma 1 y aumento en la expresión de gamma 2. La isoforma 1 en los tejido con ERTRAFAR se expreso 0.4 veces menos y la isoforma 2 se expreso 0.5 veces más que la expresión observada en los tejidos no epilépticos. Sin embargo, solo la expresión del RNAm de gamma 2 fue estadísticamente significativa con una $p \leq 0.002$.

A.



B.

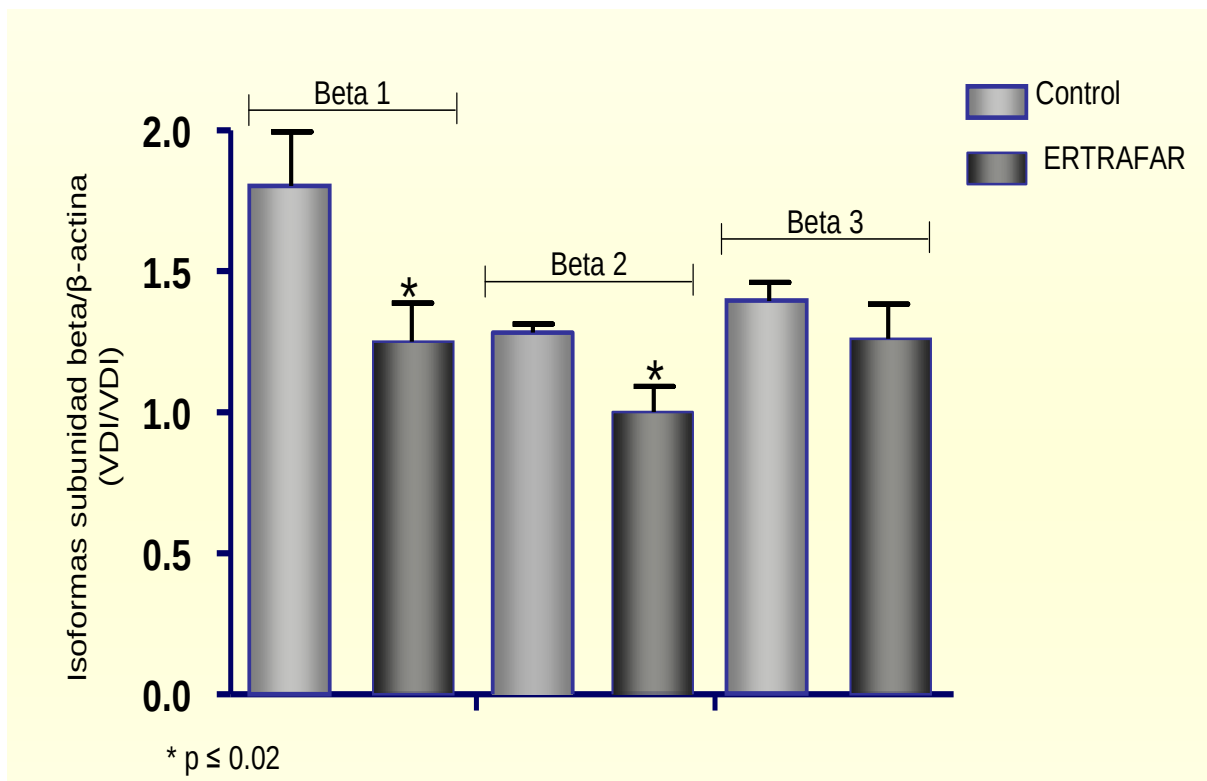
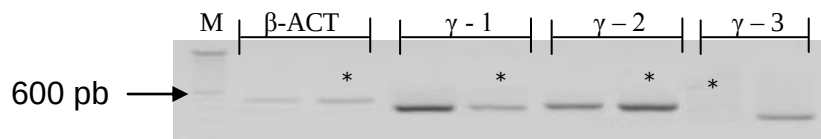


Figura 11. Expresión del RNAm la subunidad beta y de cada una de sus tres isoformas en hipocampo. A) Gel representativo del PCR que muestra la expresión cualitativa de cada isoforma de la subunidad beta (Sujetos con ERTRAFAR *; sujetos control sin asterisco). B) Valores medios normalizados de los VDIs de las isoformas de la subunidad beta entre el gen control β -actina $\pm$ el error estándar de los pacientes con ERTAFAR y sujetos control. VDI = valor de densidad integrado. t-student $p < 0.05$.

A.



B.

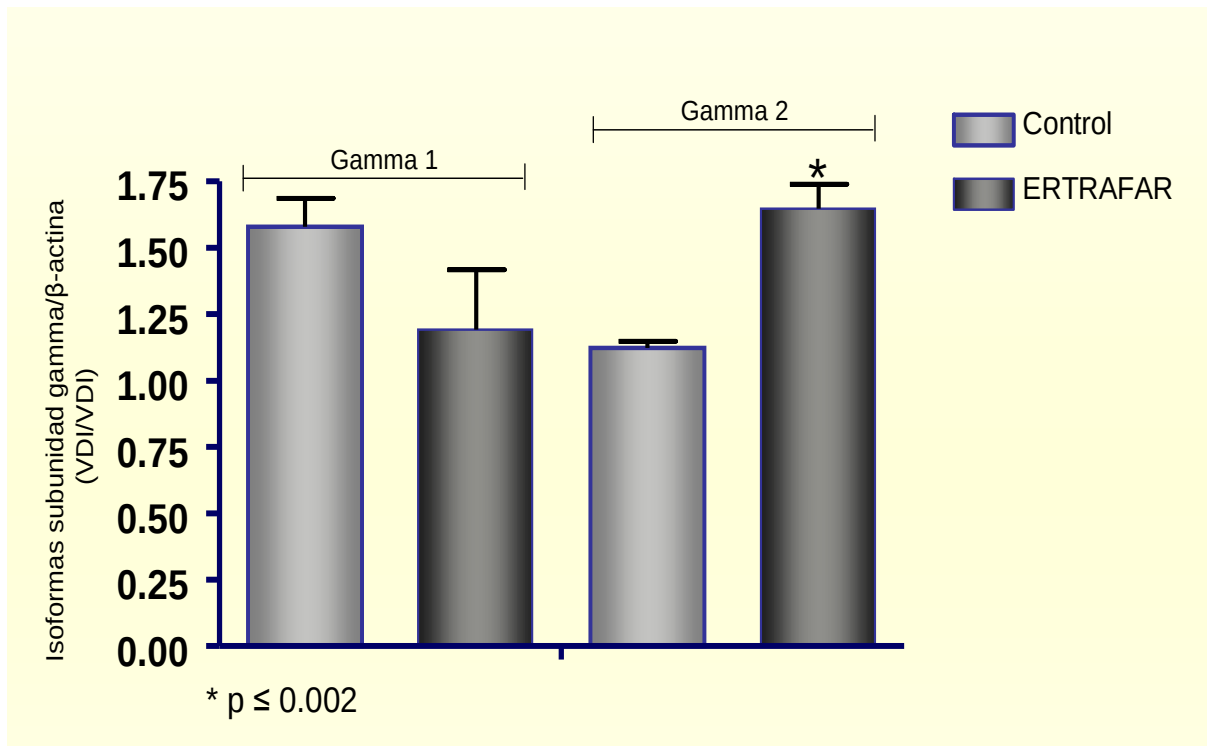
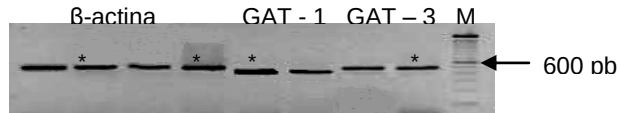


Figura 12. Expresión del RNAm de la subunidad gamma (γ) en hipocampo. A) Gel representativo del PCR que muestra la expresión cualitativa de las isoformas de la subunidad gamma (Sujetos con ERTRAFAR *; sujetos control sin asterisco). B) Valores medios normalizados de los VDIs de las isoformas de la subunidad beta entre el gen control β -actina $\pm$ el error estándar de los pacientes con ERTAFAR y sujetos control. VDI = valor de densidad integrado. t-student $p < 0.05$.

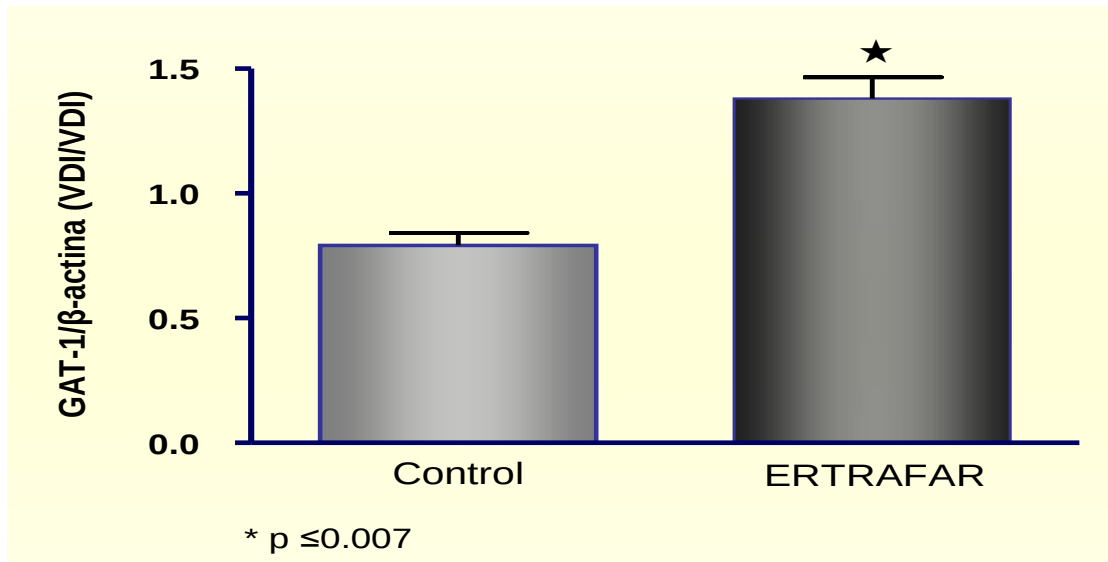
XI.5. Expresión de las moléculas transportadores de GABA (GAT-1 y GAT-3) en corteza temporal con ERTRAFAR.

Al analizar la expresión del RNAm de los transportadores de GABA (figura 13) en el tejido con ERTRAFAR encontramos que, el GAT-1 presento un nivel de expresión de 1.3 veces mas que la expresión del RNAm del gen control, mientras que el RNAm de GAT-3 se expreso 0.93 veces más que la expresión del RNAm del gen control. Por otro lado, en el tejido no epiléptico encontramos que el RNAm de GAT-1 se expreso 0.79 y GAT-3 se expreso 0.93 veces que el gen control, por lo anterior, se deduce que en el tejido con ERTRAFAR hay una sobre expresión de GAT-1 ya que la diferencia de expresión entre ambos tejidos es de 0.59 veces más en el tejido con ERTRAFAR que en el tejido no epiléptico. Esta diferencia en la expresión es estadísticamente significativa. Con respecto a la expresión de GAT-3, encontramos que no existe diferencia alguna en su expresión tanto en tejido con ERTRAFAR como en el tejido no epiléptico. Todas estas diferencias son observables de manera cualitativa en la figura 13a en la cual se puede observar el resultado de la amplificación de cada uno de los transportadores, tanto en el tejido con ERTRAFAR (bandas con asterisco), así como, en el tejido no epiléptico.

A.



B.



C.

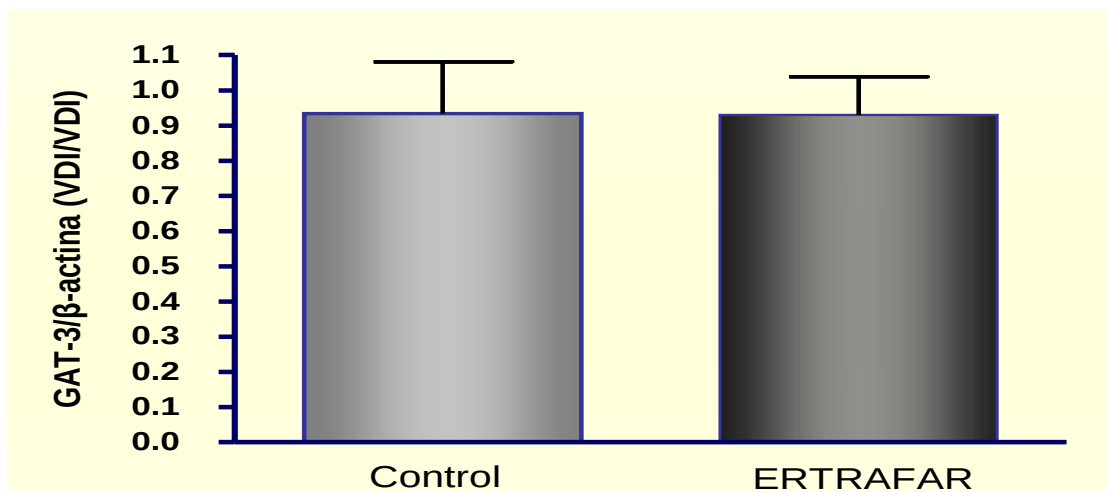
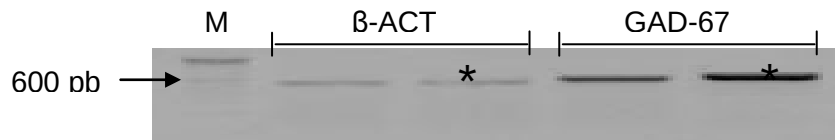


Figura 13. Expresión del RNAm de los transportadores de GABA en corteza temporal. A) Gel que muestra la expresión cualitativa del transportador GABA 1 (GAT-1) y el transportador GABA 3 (GAT-3) (Sujetos con ERTRAFAR *; sujetos control sin asterisco). B) Valores medios normalizados de los VDIs de GAT-1 entre el gen control β -actina $\pm$ el error estándar de los pacientes con ERTAFAR y sujetos control. C) Valores medios normalizados de los VDIs de GAT-3 entre el gen control β -actina $\pm$ el error estándar de los pacientes con ERTAFAR y sujetos control. VDI = valor de densidad integrado. t-student $p < 0.05$.

XI.6. Expresión de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD 67) en corteza temporal.

La expresión del RNAm de la enzima tanto en el tejido con ERTRAFAR como en el tejido no epiléptico (figura 14) fue de 1.1.2 y de 0.91 veces más que la expresión del gen control respectivamente, por lo que esto hace una variación en la expresión de 0.21 del tejido no epiléptico con respecto al tejido con ERTRAFAR el cual no fué estadísticamente significativo ($p \leq 0.13$). La diferencia en la expresión del RNAm de GAD 67, se observa de manera cualitativa en la figura 14a, en la cual se puede observar el resultado de la amplificación de la enzima tanto en el tejido con ERTRAFAR (bandas con asterisco), así como, en el tejido no epiléptico.

A.



B.

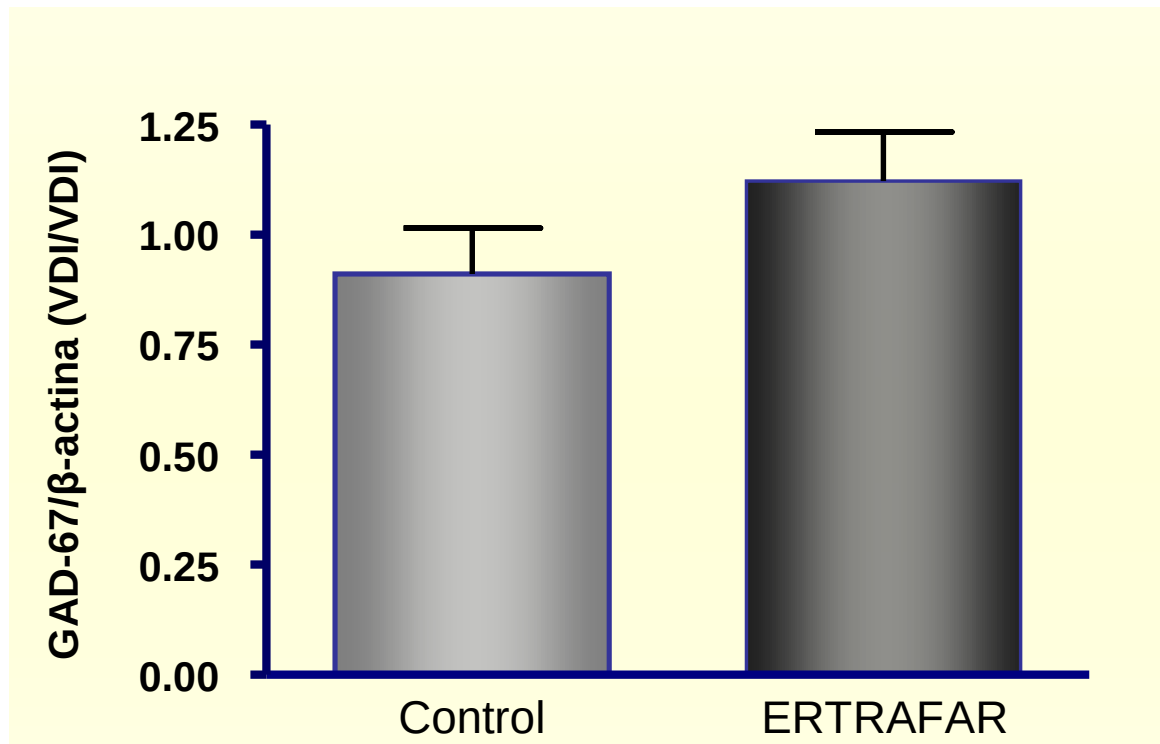
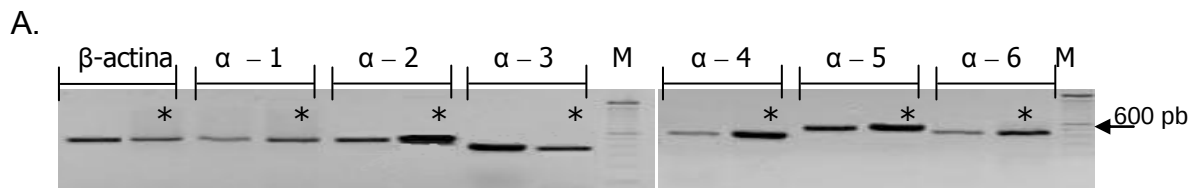


Figura 14. Expresión del RNAm de GAD 67 en corteza temporal. A) Gel representativo de la expresión de la enzima Glutamato descarboxilasa (GAD 67) (Sujetos con ERTRAFAR *; sujetos control sin asterisco). B) Valores medios normalizados de los VDIs de GAD-67 entre el gen control β -actina $\pm$ el error estándar de los pacientes con ERTAFAR y sujetos control. VDI = valor de densidad integrado. t-student $p < 0.05$.

XI.7. Expresión de las subunidades del receptor GABA_A en corteza temporal de pacientes con ERTRAFAR.

XI.7.1. Subunidad alfa

La figura 15 muestra gráficamente los valores de intensidad relativa de densidad (IDV) obtenidos para cada una de las isoformas que componen la subunidad alfa del receptor GABA_A, cabe mencionar que estos valores se calcularon con respecto a la expresión obtenida del gen control (β -actina). De las 6 isoformas de la subunidad alfa, las isoformas 1, 2, 4 y 6 presentaron mayor expresión en el tejido con ERTRAFAR con respecto al control, siendo este cambio estadísticamente significativo con una $p \leq 0.02$. Por otro lado la isoforma 3 en el tejido con ERTRAFAR presenta una disminución en su expresión con respecto a la expresión observada en el tejido no epiléptico, pero esta mínima variación en la expresión no es significativa ($p \leq 0.06$). En el caso de la isoforma 5, presentó un incremento en la expresión del RNAm de 0.2 veces con respecto al tejido no epiléptico pero esta sobre expresión no fué estadísticamente significativa ($p \leq 0.22$).



B.

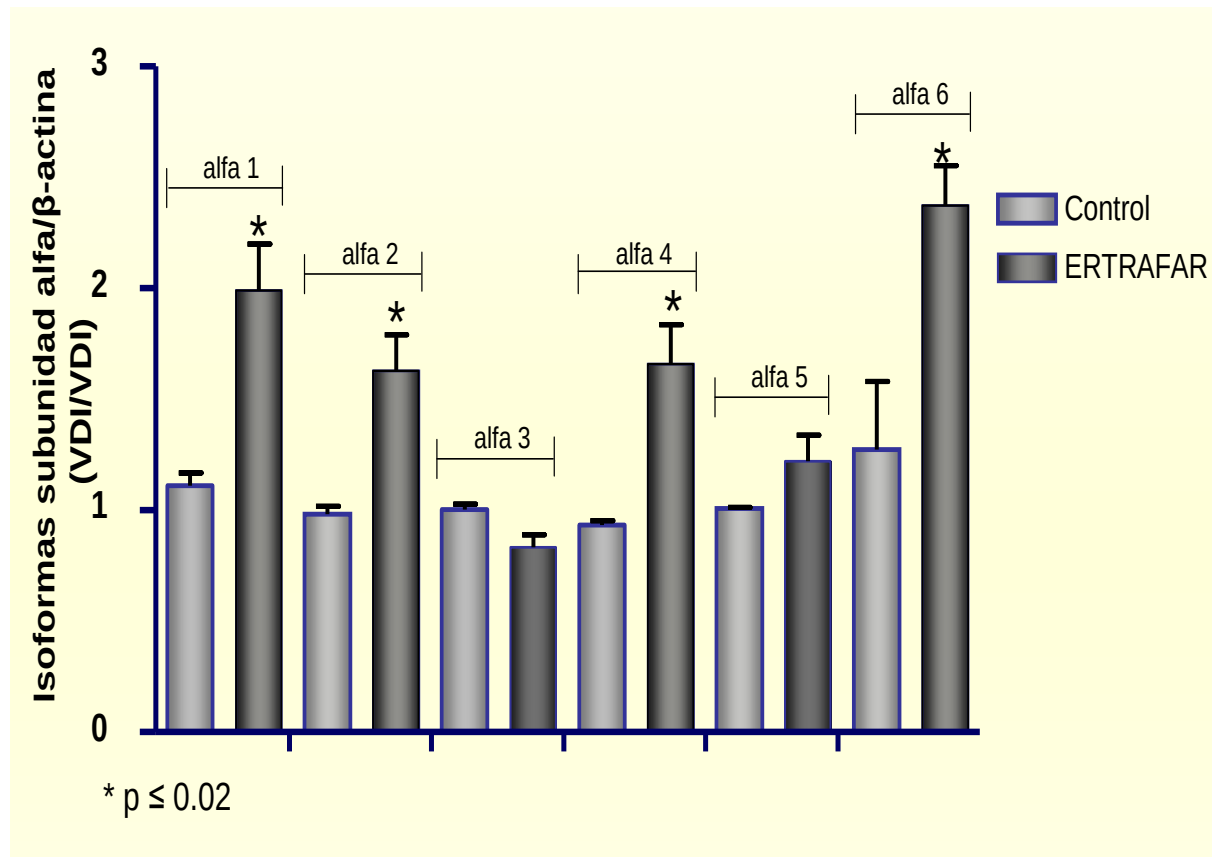


Figura 15. Expresión del RNAm de la subunidad alfa (α) y de sus respectivas isoformas en corteza temporal. A) Geles representativos de la expresión cualitativa de las isoformas de la subunidad alfa, (Sujetos con ERTRAFAR *; sujetos control sin asterisco) y B) Valores medios normalizados de los VDIs de las isoformas de la subunidad alfa entre el gen control β -actina $\pm$ el error estándar de los pacientes con ERTRAFAR y sujetos control. VDI = valor de densidad integrado. t-student $p < 0.05$.

XI.7.2. Subunidad beta.

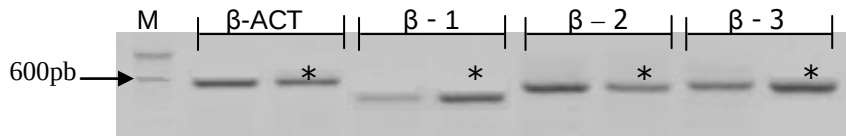
Al evaluar la expresión del RNAm de las tres isoformas que presenta la subunidad beta del receptor GABA A (figura 16), se encontró que en el tejido con ERTRAFAR, las isoformas 1 y 3 se sobre expresaron con respecto a la expresión encontradas en el tejido no epiléptico (2.22 y 1.48 para la isoforma 1 y 1.79 y 1.14 veces con respecto al gen control para la isoforma 3 en el tejido con ERTRAFAR y en tejido no epiléptico respectivamente), con una $p \leq 0.04$. Por otro lado, la isoforma 2 presenta una ligera disminución en la expresión del RNAm en el tejido con ERTRAFAR, sin embargo, esta disminución no fue estadísticamente significativa ($p \leq 0.1$).

XI.7.3. Expresión de la subunidad gamma.

De las tres isoformas que presenta la subunidad gamma del receptor GABAA (figura 17), encontramos que las isoformas 1 y 2 se expresaron 1.67 y 2.04 veces más que la expresión del gen control (β -actina) respectivamente en el tejido con ERTRAFAR mientras que en el tejido no epiléptico los valores medios de expresión fueron de 1.24 y 0.93 respectivamente. Al analizar la diferencia de expresión entre el tejido no epiléptico y el tejido con ERTRAFAR, encontramos que en este último hay una sobre expresión de 0.43 y 1.11 veces más que en el tejido no epiléptico. Por otro lado, el análisis de la expresión del RNAm de la isoforma 3, mostró una media en la expresión de 0.74 en el tejido con ERTRAFAR y de 1.0 en el tejido no

epiléptico, teniendo una disminución en el tejido con ERTRAFAR de 0.27. En ambos casos, tanto en la sobre expresión como en la disminución del RNAm de las isoformas, la diferencia de expresión encontrada fue estadísticamente significativa, con una $p \leq 0.006$.

A.



B.

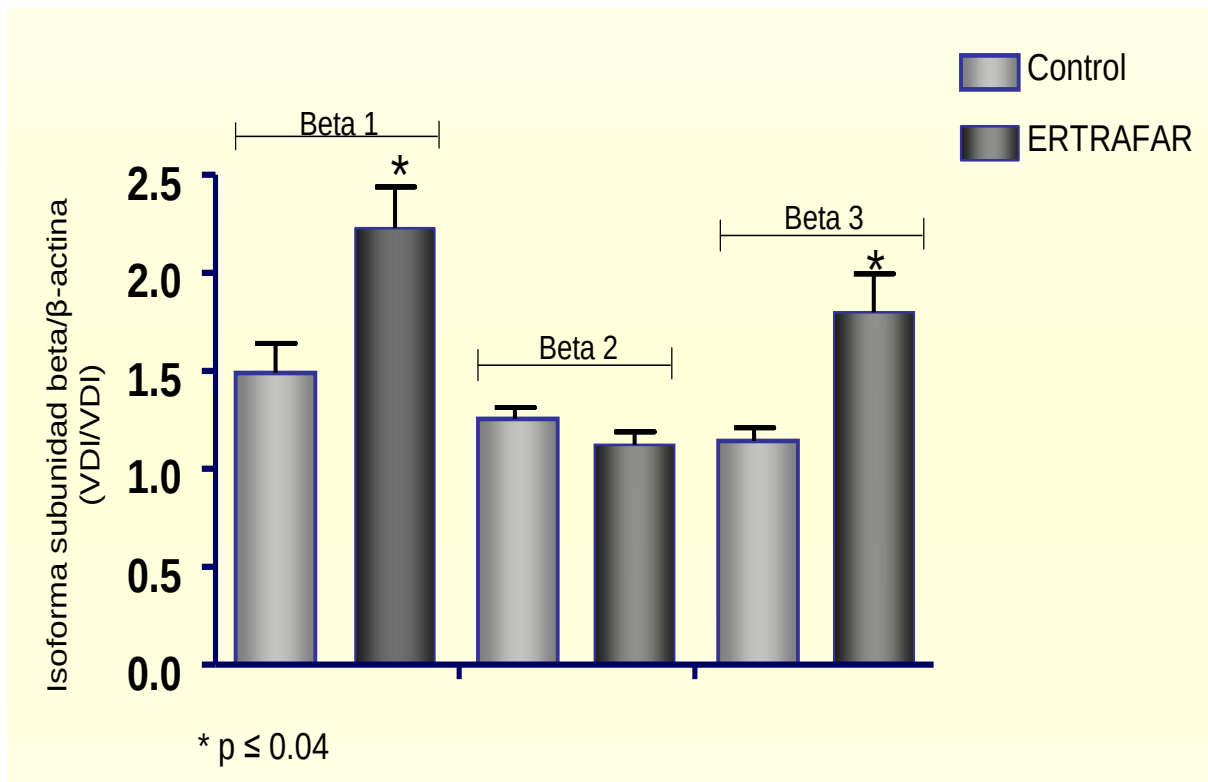
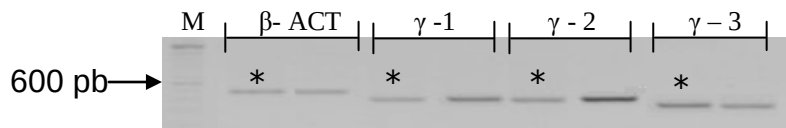


Figura 16. Expresión del RNAm la subunidad beta y de cada una de sus tres isoformas en corteza temporal. A) Gel representativo del PCR, que muestra la expresión cualitativa de cada isoforma de la subunidad beta (Sujetos con ERTRAFAR *; sujetos control sin asterisco). B) Valores medios normalizados de los VDIs de las isoformas de la subunidad beta entre el gen control β -actina $\pm$ el error estándar de los pacientes con ERTAFAR y sujetos control. VDI = valor de densidad integrado. t-student $p < 0.05$.

A.



B.

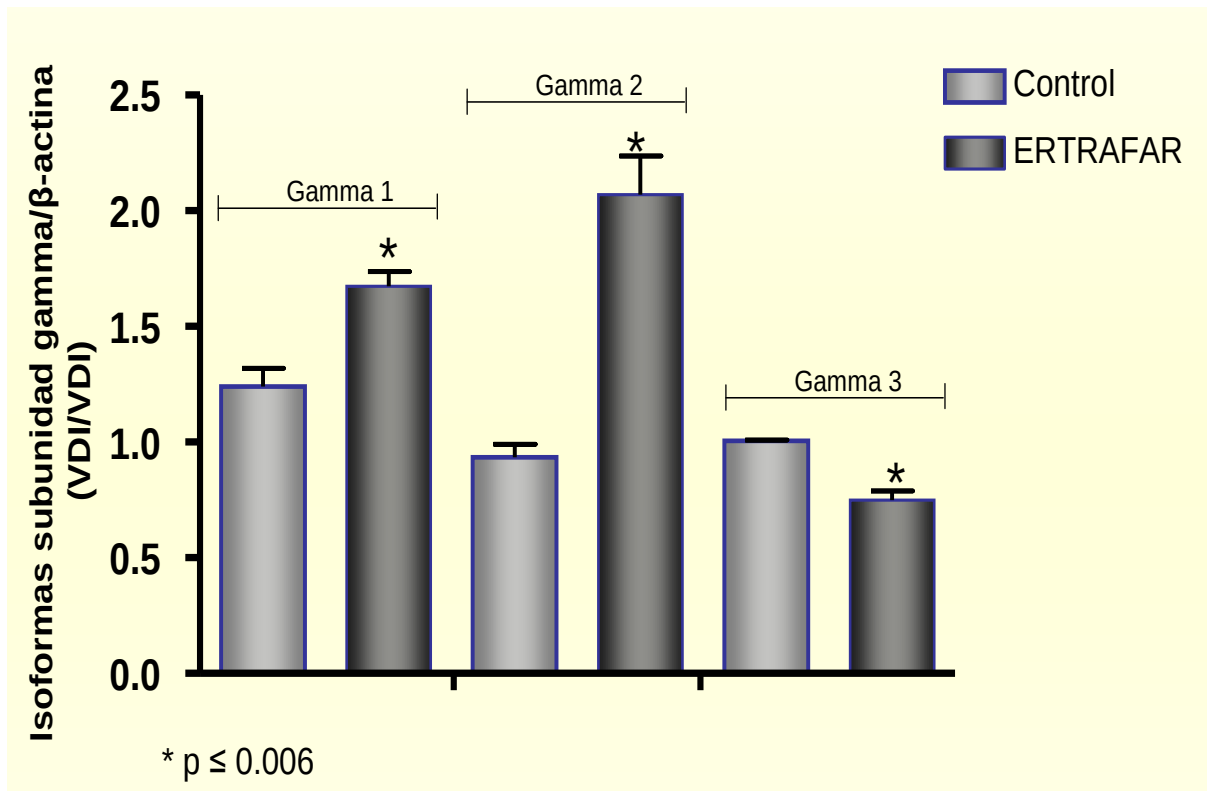


Figura 17. Expresión del RNAm de la subunidad gamma (γ) en corteza temporal. A) Gel representativo del PCR que muestra la expresión cualitativa de las isoformas de la subunidad gamma (Sujetos con ERTRAFAR *; sujetos control sin asterisco). B) Valores medios normalizados de los VDIs de las isoformas de la subunidad beta entre el gen control β -actina $\pm$ el error estándar de los pacientes con ERTAFAR y sujetos control. VDI = valor de densidad integrado. t-student $p < 0.05$.

XI.8. Correlaciones entre los niveles de expresión del RNAm de GAD-67, GAT-1, GAT-3, y de cada una de las subunidades del receptor GABA_A vs datos clínicos.

Las correlaciones se realizaron, solo en aquellos genes, donde los niveles de expresión del RNAm fueron estadísticamente significativos. Los datos clínicos (tabla 1) que se correlacionaron con los niveles de expresión del RNAm fueron cuatro; la edad en la que el paciente presento la primera crisis epiléptica, los años en los cuales el paciente presento crisis epilépticas, los años que el paciente estuvo bajo tratamiento y, el número de crisis que el paciente presentaba en un mes.

XI.8.1. Correlación de la edad en la que el paciente presento la primera crisis epiléptica y, los niveles de expresión del RNAm de los transportadores GAT-1 y GAT-3, de GAD-67 y, de las subunidades del receptor GABA_A en corteza temporal e hipocampo.

Al correlacionar los niveles de expresión del RNAm de los transportadores GAT-1 y GAT-3, de GAD-67 y, de las subunidades del receptor GABA_A, solo la expresión del RNAm de la isoforma beta 1 del receptor de GABA_A en corteza temporal, tuvo una correlación positiva con la primera crisis epiléptica, mientras que en hipocampo no se pudo establecer alguna correlación (figura 18). El coeficiente de correlación (r) para beta -1 fue de 0.5009. De acuerdo a la línea de tendencia, y la dispersión de los datos, se observa una correlación positiva, la cual nos sugiere, que

la expresión del RNAm de la subunidad beta 1 aumenta conforme aumenta la edad de inicio de la primera crisis epiléptica.

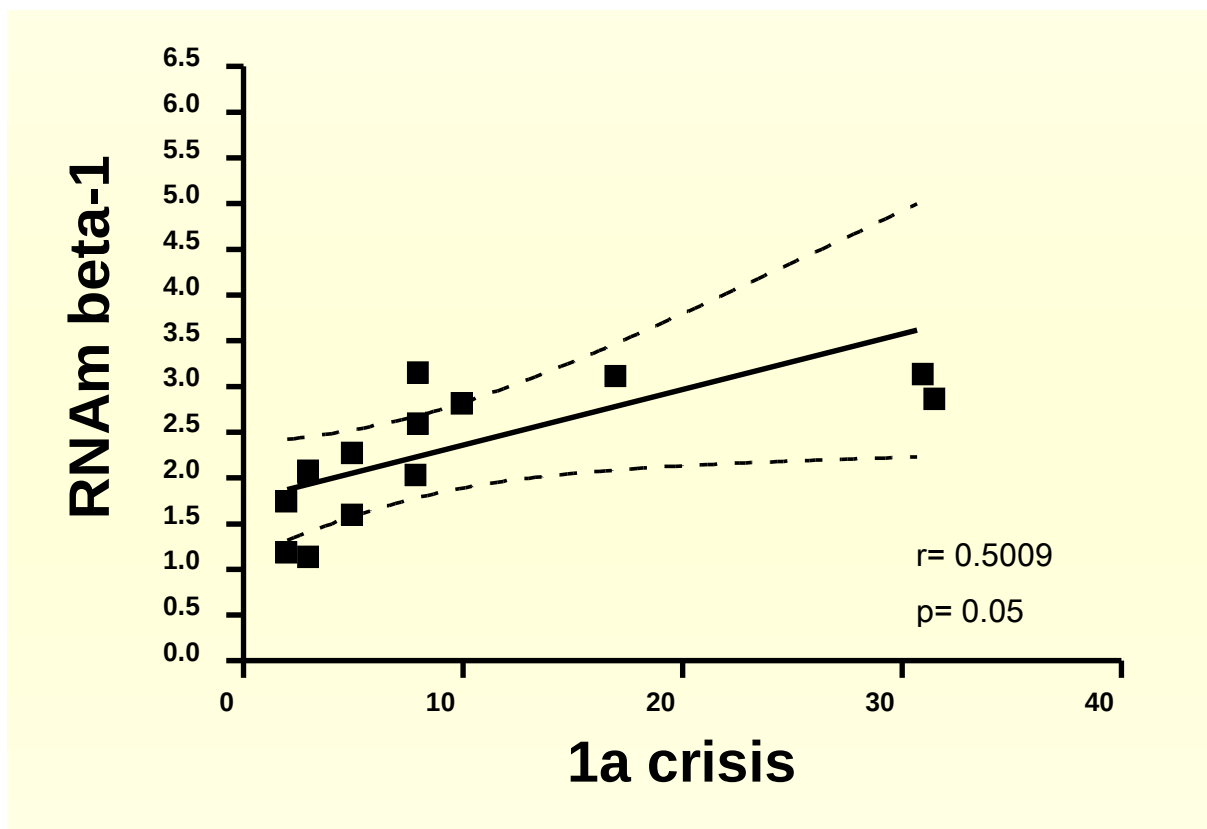


Figura 18. Correlación de la expresión del RNAm de las subunidades del receptor GABA_A en corteza temporal VS edad de la primera crisis epiléptica. La gráfica muestra la subunidad en la que hubo correlación, con una $r = 0.5009$, $p = 0.05$.

XI.8.2. Correlación de los años con crisis epilépticas y, los niveles de expresión del RNAm de los transportadores GAT-1 y GAT-3, de GAD-67 y, de las subunidades del receptor GABA_A en corteza temporal e hipocampo.

La duración de las crisis epilépticas, se refiere a los años que transcurrieron desde la primera crisis epiléptica, hasta el año que fueron sometidos a cirugía para resecar la zona epileptogénica. La figura 19, muestra los genes que correlacionaron con las crisis epilépticas. De las dos regiones cerebrales analizadas, solo en corteza temporal, se observó correlación. Los genes que correlacionaron fueron, gamma 1 y gamma 2, con una correlación de 0.2329 para gamma 1 y de 0.4535 para gamma 2. De acuerdo a la dispersión de los datos y de la línea de tendencia, se observa una correlación negativa, de tal forma que entre más años los pacientes presenten crisis epilépticas, la expresión del RNAm tanto de la isoforma gamma 1 como de la isoforma gamma 2, tiende a disminuir.

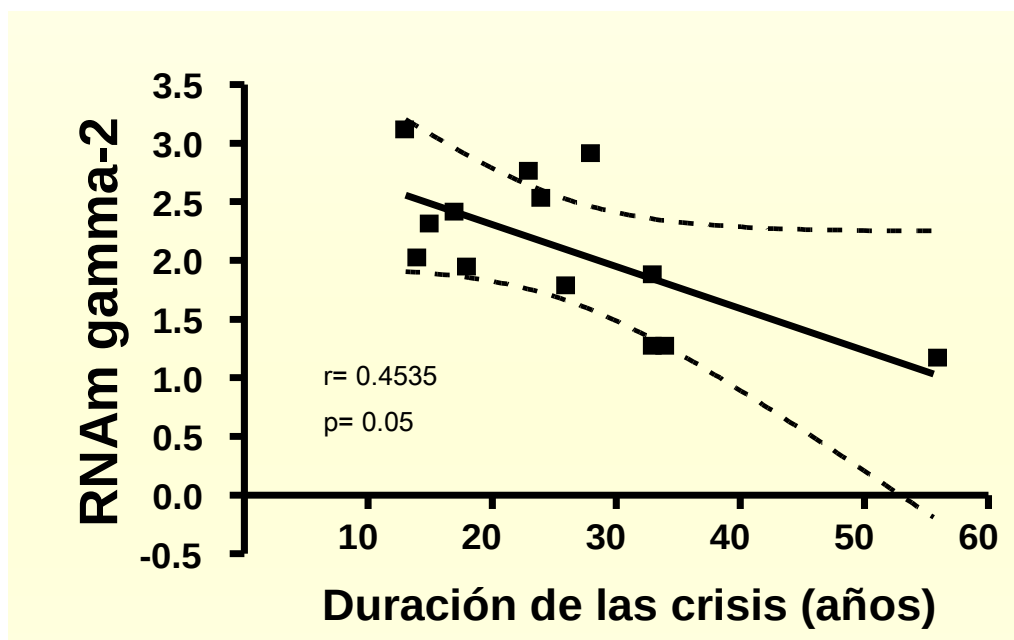
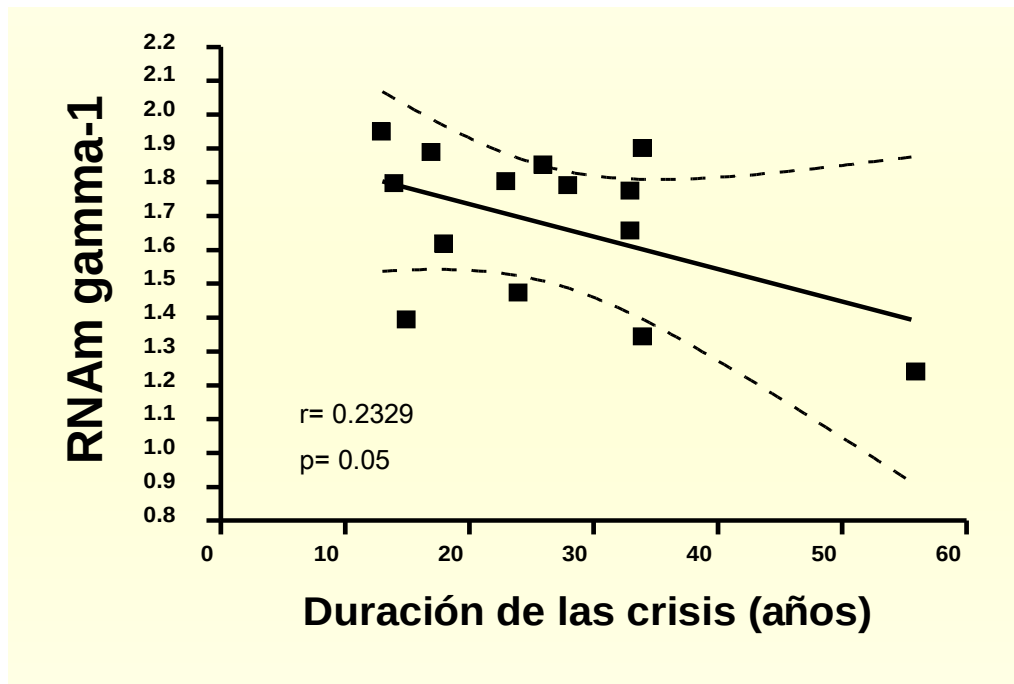


Figura 19. Correlación de la expresión del RNAm de las subunidades del receptor GABA_A en corteza temporal VS años con crisis epilépticas. El periodo que se consideró para cuantificar los años con presencia de crisis epilépticas, comprende la edad en la que se presentó la primera crisis hasta el año que el paciente fue sometido a cirugía, para la eliminación de la zona epileptogénica. Los gráficos muestran las subunidades en las que hubo correlación.

XI.8.3. Correlación de la frecuencia de las crisis epilépticas y, los niveles de expresión del RNAm de los transportadores GAT-1 y GAT-3, de GAD-67 y, de las subunidades del receptor GABA_A en corteza temporal e hipocampo.

Las frecuencias de las crisis epilépticas, se refiere al número de crisis presentadas por cada uno de los casos analizados durante un mes. La figura 20, muestra los genes por región cerebral estudiada, en los que existe una correlación. En hipocampo, la subunidad beta 1 fue la única que correlaciono con una $r = 0.5720$, mientras que en corteza temporal, el gen que correlaciono fue gamma 2, con una $r = 0.2534$. La dispersión de los datos en cada uno de los gráficos y, de acuerdo al coeficiente de correlación (r), se puede observar que al aumentar el número de crisis epilépticas por mes, hay una tendencia a aumentar la expresión del RNAm de la isoforma beta 2 en hipocampo y la isoforma gamma 2 en corteza temporal.

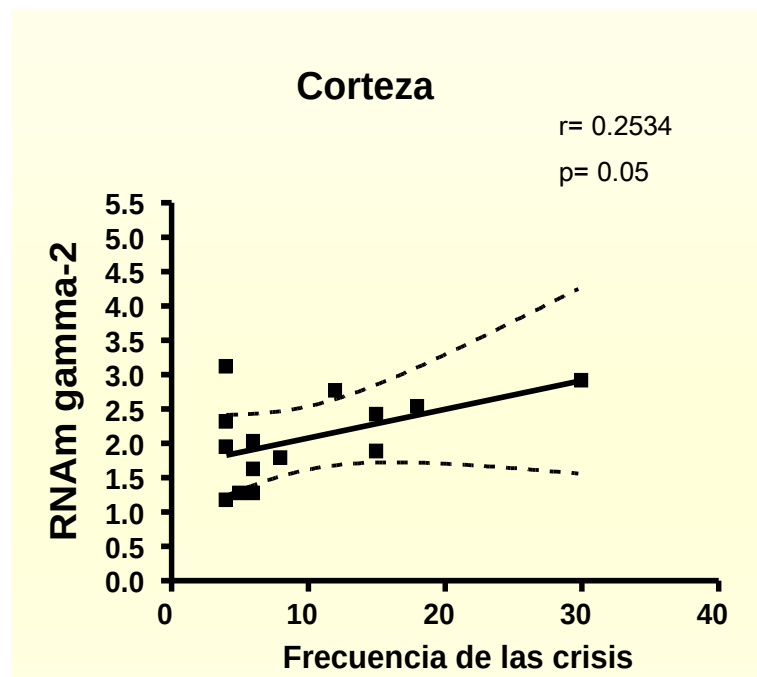
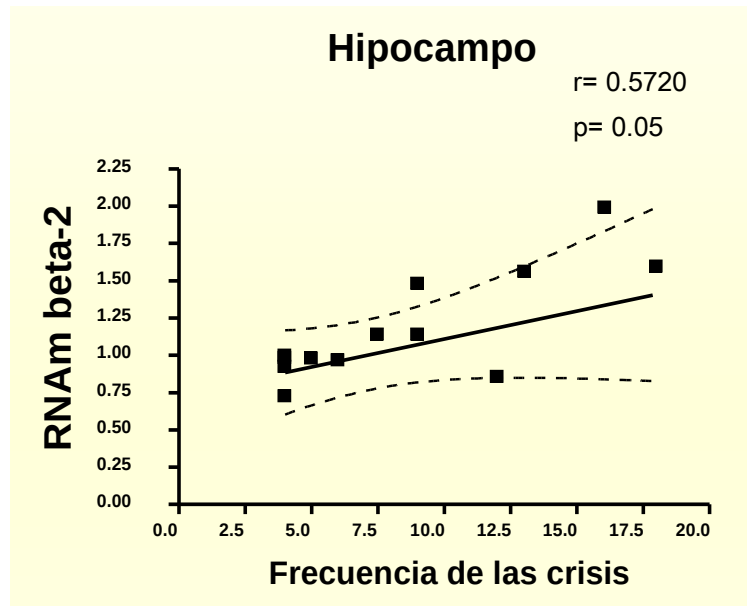


Figura 20. Correlación entre la expresión del RNAm de las subunidades del receptor GABA_A VS el número de crisis epilépticas que presentó cada paciente, antes de ser sometido a cirugía, para la eliminación de la zona epileptogénica. Los gráficos muestran las subunidades en las que hubo correlación.

XI.8.4. Correlación de los años con tratamiento antiepiléptico y, los niveles de expresión del RNAm de los transportadores GAT-1 y GAT-3, de GAD-67 y, de las subunidades del receptor GABA_A en corteza temporal e hipocampo.

Los años con tratamiento se cuantificaron a partir del momento en el cual, el paciente recibió algún DAE dirigido a potenciar la neurotransmisión GABAérgica. La figura 21 muestra los genes que correlacionaron con los años de tratamiento. En hipocampo solo la subunidad alfa 1 correlaciono con una $r = 0.2361$, mientras que en corteza temporal, los genes que correlacionaron fueron la subunidad alfa 1, alfa 4, alfa 6, gamma1 y gamma2 con una r de 0.3711, 0.2921, 0.7477, 0.3649 y 0.4288 respectivamente. En hipocampo, podemos observar que la correlación entre los niveles de expresión del RNAm de alfa 1 y los años en tratamiento es del 23%, con una ligera tendencia a aumentar en relación a los años de tratamiento. En corteza, podemos observar que la línea de tendencia en cada uno de los gráficos, es negativa indicándonos que y de acuerdo a la dispersión de los datos, entre más años este el paciente bajo tratamiento, la expresión del RNAm de las subunidades alfa 1, alfa 4, alfa 6, gamma 1 y gamma 2 disminuyen.

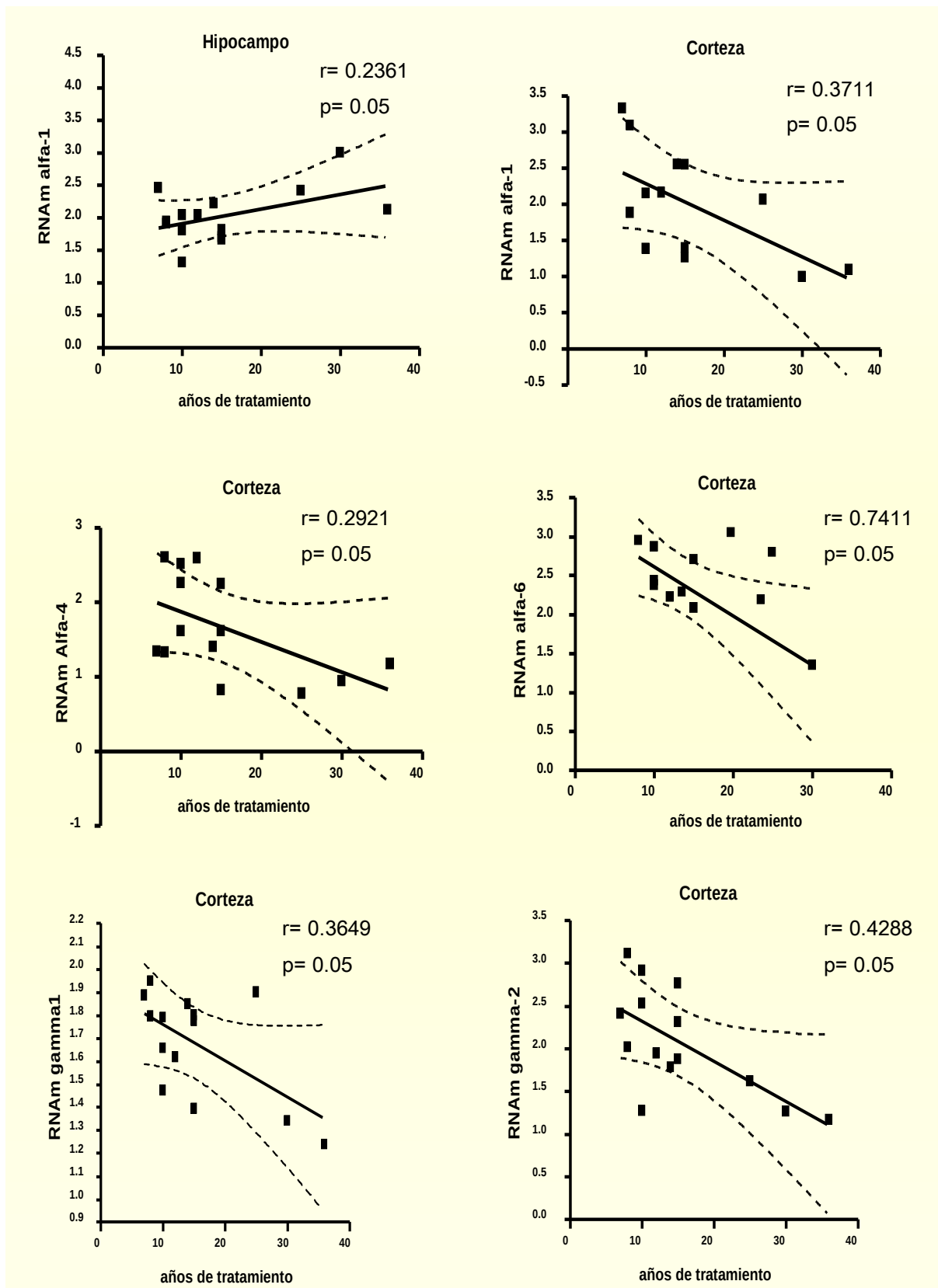


Figura 21 Correlación entre la expresión del RNAm de las subunidades del receptor GABA_A VS años de tratamiento. Los años bajo tratamiento, comprende desde el año en el que se le suministro un primer DAE relacionado con la neurotransmisión GABAérgicas, hasta su cirugía, para la eliminación de la zona epileptogénica. Los gráficos muestran las subunidades en las que hubo correlación.

XII. Discusión.

A pesar de los estudios realizados en los últimos años sobre la participación de los principales componentes de la neurotransmisión GABAérgica a nivel proteico en tejido resecado de pacientes, se conoce muy poco de lo que esta pasando a nivel molecular. La poca información sobre la expresión del RNAm en ERTRAFAR se ha obtenido mediante el uso de modelos de refractariedad los cuales a pesar del enorme esfuerzo no logran semejar al 100% lo que esta pasando en el tejido humano.

En la ELT las principales regiones cerebrales involucradas en la generación y propagación de las crisis son hipocampo, amígdala y corteza, sin embargo el hipocampo es la región principal donde se desarrolla el foco epiléptico, descrita por Ebner (2001) como zona epileptogénica o área del encéfalo necesaria y suficiente para iniciar las crisis y cuya resección o desconexión es requerida para que las mismas cesen. El foco epileptogénico o primario puede reclutar otras zonas del encéfalo como la corteza, transformándola en focos secundarios formando la zona de propagación. La expresión del RNAm de los principales componentes de la neurotransmisión GABAérgica fue evaluada en estas dos áreas cerebrales hipocampo y corteza temporal.

Los resultados del presente trabajo demuestran, que en la ERTRAFAR se producen alteraciones en la expresión del RNAm de los principales componentes de

la neurotransmisión GABAérgica (figura 19), como lo son las subunidades que conforman el receptor ionotrópico de GABA (GABA_A), las moléculas encargadas de la recaptura de GABA conocidas como transportadores de GABA (GAT-1 y GAT-3), así como de la principal enzima limitante de GABA, glutamato descarboxilasa o GAD-67; y algunas de estas alteraciones pueden estar influenciadas por los años de tratamiento, el número de crisis epilépticas, la edad de inicio de las crisis epilépticas y los años que han presentado crisis epilépticas.

XII.1. Expresión de los transportadores.

Después de la liberación de GABA este es removido de la hendidura sináptica por los transportadores GAT-1 y GAT-3, para así mantener los niveles basales del neurotransmisor (figura 18). Este mecanismo es calcio independiente y se activa en condiciones de actividad neuronal intensa como la epilepsia y la isquemia, lo anterior produce un aumento en el sodio intracelular y genera despolarización celular. El transportador GAT-1 tiene una actividad dual ya que no solo permite la recaptura de GABA sino que también pueden liberarlo de nuevo al espacio intersináptico (Olson y DeLorey, 1999), de esta forma, la liberación de GABA por inversión del transportador puede ser crítica para mantener el tono inhibitorio y suprimir la actividad epiléptica (During y cols., 1995).

Los resultados de este trabajo muestran diferentes modificaciones en los niveles de expresión del RNAm. En corteza se observó una sobre expresión de

GAT-1 pero sin cambio alguno en GAT-3 (figura 8). Por otro lado en hipocampo (figura 12), tanto GAT-1 como GAT-3 presentaron una disminución en los niveles de expresión del RNAm en el tejido con ERTRAFAR con respecto a los niveles observados en los tejidos no epilépticos, pero solo la disminución observada en GAT-3 fue estadísticamente significativa. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos en modelos animales de ELT. Hirao y cols. (1998), encontraron que el RNAm de ambos transportadores aumentaba minutos después de someter las ratas al kindling, pero después de 8 horas de la estimulación regresaban a sus niveles normales de expresión. Mientras que Sperk y cols. (2003), en un modelo con ácido kaínico encontraron una disminución transitoria en la expresión del RNAm de GAT-3, así como, un aumento transitorio en la expresión del RNAm de GAT-1 después de la inducción de las crisis, el cual regresa a sus niveles iniciales, lo que sugiere, que el GABA intracelular no proviene de la liberación vesicular, sino que, es liberado por acción de GAT-1, durante las crisis epilépticas, tratando de proteger a las neuronas de la sobre excitación, es decir, que el aumento en la expresión del RNAm de GAT-1 en corteza, muy probablemente se deba a un efecto compensatorio con la finalidad de reducir la hiperexcitabilidad neuronal, evitando un mayor daño neuronal. Además, los resultados comprueban que los procesos de desarrollo de la epilepsia en humanos y en modelos experimentales no son necesariamente paralelos.

Por otro lado la disminución en la expresión del RNAm de los transportadores observada en hipocampo con ERTRAFAR nos puede “sugerir” un paralelismo con la expresión proteica, lo cual ya ha sido demostrado por Mathern (1999), quien

demostró una reducción en la inmunoreactividad neuronal y glial para GAT-1 y GAT-3 respectivamente en tejido de pacientes refractarios a tratamiento. Esto se debe probablemente a la baja concentración de GABA encontrados en las fases interictal en hipocampo epiléptico de humanos, así como durante las crisis epilépticas comparadas con los niveles encontrados en las áreas sin actividad epiléptica, los cuales fueron medidos por estudios de microdiálisis (Durin y Spencer, 1993; During y cols., 1995). La disminución en los niveles de expresión del RNAm de los transportadores en hipocampo puede estar relacionada directamente con la disminución de la síntesis de GABA producido por la pérdida neuronal principalmente de interneuronas GABAérgicas (Engel, 1996; Marco y cols., 1996; Fisher y cols., 1998) Lo cual ha sido observado en tejido resecado de pacientes epilépticos así como, en los estudios realizados en modelos de animales de ELT que muestran pérdidas de interneuronas, proliferación de células gliales, neurogénesis y proliferación (*sprouting*) de terminales axónicas; así como, la aparición de circuitos excitadores recurrentes y la reorganización morfológica y funcional de los circuitos afectados, lo que a su vez parece contribuir a generar crisis espontáneas (Sayin y cols., 2003; Morimoto y cols., 2004; Crespel y cols., 2005). Por otro lado, se ha demostrado que GAT-1 presenta una actividad dual durante las crisis epilépticas (Borden, 1996), lo cual genera un eflujo de GABA al medio extracelular, es decir, puede liberar GABA al espacio extracelular durante las crisis epilépticas y así contribuir al control de las mismas mediante la regulación de la actividad hiper-sincronizada de las células. Pero como el análisis de la expresión del RNAm de GAT-1 se hizo en hipocampo completo y no en una región hipocampal, y debido a la

presencia de esclerosis hipocampal, que genera una gran pérdida neuronal, la expresión del RNAm en el hipocampo disminuyó, lo cual sugiere que la liberación de GABA al espacio intercelular mediada por GAT-1, genere disminución en la concentración del GABA extracelular como se ha observado en los estudios por microdiálisis (Durin y Spencer, 1993; During y cols., 1995). Esto probablemente, genera un desequilibrio en la homeostasis del SNC, que lleva a la descontrolada excitabilidad neuronal.

XII.2. Expresión de GAD 67.

Los hallazgos obtenidos en hipocampo proveen evidencias de que la ELT modifica la expresión del RNAm de la enzima limitante en la síntesis de GABA (figura 9). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Neder y cols. (2002), quienes mediante la técnica RT-PCR semicuantitativa analizaron la expresión del RNAm de GAD 67 en tejido resecado de pacientes con ERTRAFAR encontrando que la expresión del RNAm aumentaba con respecto a la expresión del RNAm de los tejidos no epilépticos, en el mismo contexto pero mediante inmunoreactividad Mathern y cols., (1999) reportaron una sobre expresión de la enzima GAD 67 en hipocampo resecado de pacientes con ERTRAFAR. Lo anterior, concuerda con los resultados obtenidos en modelos de ELT (Esclapez y Houser, 1999; Freichel y cols., 2006), en los cuales, mediante el uso de las técnicas de hibridación in situ e inmunohistoquímica, demostraron que tanto el RNAm como la proteína se incrementaban paralelamente.

El incremento en la expresión del RNAm de GAD 67 observado en nuestros resultados, probablemente se deba a las interneuronas hipocampales que se preservaron, las cuales forman una red funcional. Esta red funcional probablemente, incrementa su actividad neuronal, para compensar la pérdida de interneuronas generada por la excitotoxicidad, provocada por la sobre estimulación de los receptores de glutamato (Esclapez y Houser, 1999; Pellegrini-Giampietro y cols., 1997); de tal forma, que la red de Interneuronas continua funcionalmente conectada con sus neuronas excitatorias aferentes (células piramidales), las cuales al aumentar su actividad estimulan a las interneuronas, formando un circuito inhibitorio de retroalimentación (Rempe, 1997).

El incremento en la expresión del RNAm de la enzima, nos puede estar indicando, que probablemente se incrementa la síntesis de GABA para contrarrestar la hiperexcitabilidad neuronal. Por otro lado, la expresión del RNAm de GAD 67 en corteza fue mayor a los niveles de expresión encontrados en corteza de los tejidos no epilépticos (controles), pero este aumento no fue significativo, lo anterior se puede deber a la sobre expresión de GAT-1 cuya función es de capturar GABA e introducirlo de nuevo a la neurona presináptica manteniendo constante la poza de GABA (Millar y cols., 1997), lo que genera un mecanismo intrínseco de autorregulación, que regula de forma indirecta la activación de la síntesis del RNAm de GAD, enzima limitante en la síntesis de GABA (Martin y Rimvall, 1993).

Por otro lado, el incremento en la expresión del RNAm de GAD-67 en corteza, puede deberse a la pérdida neuronal, observada en tejido resecado de pacientes con ELT (Du y cols., 1993; Lorigados y cols., 2007), así como, en modelos (Schwob y cols., 1980; Du y cols., 1995 y Sanjay y Buckmaster, 2006). Esta pérdida neuronal, ocasionada por la sobre excitación asociada a múltiples crisis epilépticas que, eliminan las principales vías de activación de las interneuronas, genera la pérdida de la inhibición y prevalencia de la acción excitatoria (hiperexcitabilidad), mediada por células granulares provenientes del giro dentado (Sloviter. 1991); hipótesis que en un inicio, fue formulada para el hipocampo y, que tiene aplicación en la corteza entorrinal (Bear y cols., 1995; Eid y cols., 1999; Sanjay y Buckmaster, 2006). La desconexión de la inhibición asociada a la pérdida neuronal, puede estar generando que las interneuronas GABAérgicas sobrevivientes aumenten la expresión del gen GAD-67 para aumentar la producción de GABA y poder de este modo tratar de controlar la hiperexcitabilidad en la corteza generada por las crisis epilépticas.

XII.3. Expresión de las subunidades del receptor GABA_A.

Los receptores GABA_A son responsables de la inhibición fásica y tónica del SNC, siendo los principales blancos de los fármacos antiepilépticos. Así, al entender las variaciones en la composición de las subunidades del receptor GABA_A, las cuales determinan su papel funcional, nos permitiría diseñar nuevos fármacos más eficaces (Farrant y Nusser, 2005).

El análisis de la expresión del RNAm de las 15 isoformas que comprenden las tres subunidades de GABA_A (α 1- α 6, β 1- β 3, γ 1- γ 3) mostró grandes diferencias en su expresión (figuras 10-12 y figuras 15-17). En corteza, las subunidades que tuvieron un incremento estadísticamente significativo fueron, alfa 1, alfa 2, alfa 4, alfa 6, beta 1, beta 3 así como, gamma1 y gamma 2, mientras que la subunidad gamma 3 disminuyó significativamente. Estos resultados no concuerdan del todo con trabajos previos realizados en modelos animales, en donde se observó que en las células piramidales de la corteza, las isoformas de las subunidades que se sobre expresan son, alfa 1, alfa 3, beta 1, beta 2; mientras que las subunidades que disminuyeron su expresión fueron alfa 2, alfa 4, alfa 5, beta 3 y gamma 2 (Tsunashima y cols., 1997; Nishimura y cols. 2005).

Por otro lado, los cambios observados en hipocampo fueron, una sobre expresión en las isoformas alfa 1, alfa 4, gamma 2 y, disminución en la expresión de las isoformas alfa 2, alfa 3, beta 1 y beta 2. Estos resultados, difieren con trabajos realizados en modelos de ELT; así como, en tejidos resecados de pacientes con ELT. Por ejemplo, Pirker y cols. (2003) mediante hibridación in situ encontró una sobre expresión de las isoformas beta 2 y beta 3 en hipocampo resecado de pacientes con ERTRAFAR, los cuales concuerdan con nuestros resultados. Tsunashima y cols. (1997), en un modelo de ácido kaínico en hipocampo de ratas, encontraron disminuidas las isoformas alfa 2, alfa 3, alfa 5, beta 1, beta 3 y gamma 2, mientras que alfa 1, alfa 4 y beta 2 estaban sobre expresadas; pero Sperk y cols. (1998), con el mismo modelo en varias regiones del hipocampo encontraron

incrementadas α 1, α 2, α 4, β 1, β 2 y β 3. Nishimura y cols. (2005) con un modelo de ELT por kindling hipocampal encontraron aumentos en las tres isoformas de β , de γ 2 y α 4. Como observamos, los modelos utilizados en el estudio de la ERTRAFAR no reproducen los resultados obtenidos en tejido de paciente, porque en los modelos no se aplican politerapias para el control de las crisis, además en el tejido resecado de pacientes con ELT no se controlan las variables como el tiempo de exposición al fármaco, la edad y la duración de las crisis epilépticas.

Las alteraciones en la expresión de las subunidades del receptor de GABA_A se han descrito previamente, en neuronas de ratas epilépticas adultas, correlacionándose este efecto con modificaciones importantes en la función del receptor (Brooks-Kayal y cols., 1998; Schwarzer y cols., 1997). Recientemente, se ha estudiado el efecto que tiene los cambios selectivos en los subtipos del receptor GABA_A en los circuitos corticales (sustancia blanca), en pacientes con epilepsia focal (Loup y cols., 2009) y como, esta nueva organización es compatible con la estructura presente en la red inhibitoria funcionalmente integra que cubre la sustancia gris. Estos cambios sugieren, como la morfología de las dendritas de la sustancia blanca, permiten un nuevo arreglo de los circuitos neuronales para controlar la hiperexcitación. Además, se sabe que la disminución de la subunidad α 1 del receptor de GABA_A altera tanto el sitio de unión del receptor como la respuesta farmacológica a las BDZ (Kralic y cols. 2002). Por otro lado, se ha demostrado que los receptores que contienen en su estructura las subunidades α 1, α 2, α 3 y α 5, la

subunidad beta principalmente $\beta 2$ y $\beta 3$ y en casi todos los casos $\gamma 2$ con una relación 2:2:1 presentan alta afinidad para las benzodiazepinas, flunitrazepam, diazepam y clonazepam (Pritchett y cols., 1989; Luddens y Wisden, 1991; Möhler y cols., 2002). Adicionalmente, la presencia de $\alpha 4$ y $\alpha 6$ condicionan la sensibilidad del receptor hacia las BZD (Olsen y cols., 1999), además, si la subunidad $\gamma 2$ es reemplazada por la subunidad $\gamma 1$ o por la subunidad δ se crea un receptor insensible a BZD lo cual conlleva al desarrollo de refractariedad (Ymer y cols., 1990; Puia y cols., 1991; Wisden y cols., 1991; Saxena y Macdonald, 1994). Del mismo modo, los receptores que en su estructura contienen la isoforma $\alpha 4$ en asociación con las isoformas gamma o delta, conforman receptores insensibles a BZD (Möhler y cols., 2002).

En estudios realizados en pacientes con esclerosis hipocampal, se ha observado alteraciones en la fijación o binding del flunitrazepam en los sitios de unión a BZD; es decir, hay pérdida de la sensibilidad de los sitios de unión a BZD, atribuido a los cambios en la composición del receptor GABA_A por disminución de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 5$ y aumento de $\alpha 4$ y $\alpha 6$ los cuales reducen la sensibilidad a las BZD (Olsen y Avoli, 1997).

Por otro lado se conoce que la ERTRAFAR, la politerapia; así como, el tiempo de evolución de la ELT producen modulación de los receptores de BDZ, con la alteración de las subunidades específicas del receptor (Loscher y Schmidt, 2006). Por esto es posible que las subunidades del receptor de GABA_A que fueron expresadas en cantidades excesivas, sea en parte, un mecanismo compensatorio

inducido por las crisis. Estas alteraciones son complejas e incluyen una sobrerregulación (upregulation) y subregulación (downregulation) de las diferentes subunidades, así como diferencias en el nivel de expresión de las subunidades entre el hipocampo y la corteza temporal. Además el efecto de los barbitúricos sobre el receptor GABA_A, depende en gran parte de la subunidad beta y su actividad agonista es influenciada substancialmente por la subunidad alfa (Bureau y Olsen, 1993; Mathews y cols., 1996; Thompson y cols. 1996; Olsen, 2002). Por ello, las alteraciones observadas en la subunidad alfa muy probablemente se deban a la prolongada politerapia, principalmente con agonistas de GABA como las benzodiazepinas (Löscher y Schmidt, 2006). Lo anterior, probablemente induzca alteraciones en el ensamblaje del receptor y por consiguiente afecta la sensibilidad a sus agonistas produciendo un pobre control de las crisis epilépticas.

XII.4. Correlaciones entre los niveles de expresión del RNAm de GAD-67, GAT-1, GAT-3, y de cada una de las subunidades del receptor GABA_A vs datos clínicos.

Las correlaciones muestran, que la expresión del RNAm de algunos genes involucrados en la neurotransmisión GABAérgica, puede verse afectados por ciertas condiciones fisiopatológicas que suceden durante el padecimiento de la ERTRAFAR, pero solo algunas, pueden alterar la expresión del RNAm en corteza temporal y no en hipocampo. Esto puede ser porque en el adulto, la plasticidad neuronal, que es la capacidad de alterar las sinapsis existentes y generar nuevas sinapsis; a pesar de no estar totalmente abolida, esta muy disminuida (Purves y cols., 2001). Estas

condiciones fisiopatológicas, pueden producir alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica, produciendo cambios en la expresión de los genes de las subunidades, en la síntesis de proteína, y en el ensamblado del receptor (Ito y cols., 1996).

En nuestros resultados, se puede inferir que la edad de inicio de las crisis epilépticas (figura 18), puede alterar la expresión de RNAm de la isoforma beta 1 en corteza temporal de forma positiva; es decir, entre más aumente la edad de inicio de las crisis epilépticas, aumenta la expresión del RNAm. La duración de las crisis epilépticas, aparentemente, actúa de manera negativa sobre la expresión del RNAm de las isoformas gamma 1 y gamma 2 (figura 19); es decir, entre más años este el enfermo con crisis epilépticas, la expresión del RNAm de ambas isoformas tiende a disminuir. La frecuencia de las crisis epilépticas (figura 20), parece ser que solo afecta la expresión del RNAm de la isoforma beta 2 en hipocampo y, la isoforma gamma 2 en corteza temporal. El efecto que se puede observar sobre ambas isoformas del receptor, en corteza temporal e hipocampo, es positivo, entre mayor sea el número de crisis epilépticas, la expresión del RNAm de las isoformas beta 2 y gamma 2 aumenta. Ambas condiciones fisiopatológicas (duración y frecuencia de las crisis epilépticas), aunque no se tiene un estudio relevante del efecto que generan estas condiciones fisiopatológicas sobre la expresión del RNAm de estas subunidades, probablemente, tanto el número como los años padeciendo crisis epilépticas estén modificando la expresión del RNAm, a través de la alteración del balance entre la excitación y la inhibición del SNC. La sobre excitación de la neurona, genera la activación del sistema inhibitorio GABAérgico para restablecer la

homeostasis del SNC (Treiman, 2001), activándose la producción de RNAm que genera mayor síntesis de proteína como las isoformas del receptor GABA_A.

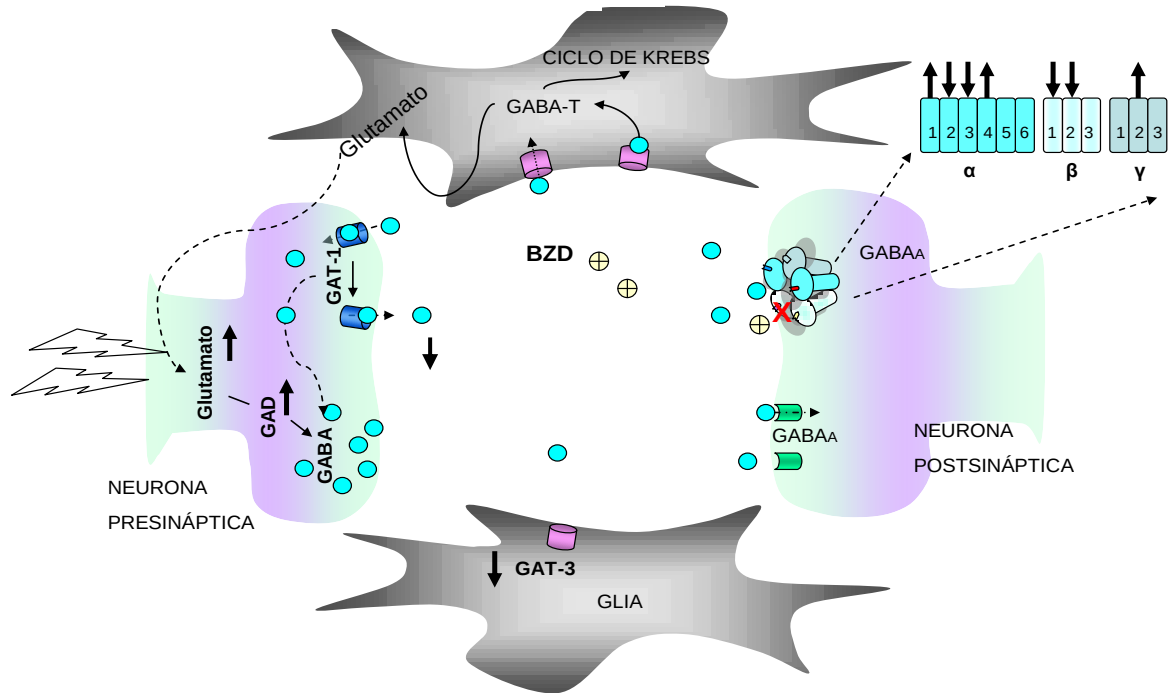
En la figura 21, se observa el efecto que tiene sobre la expresión del RNAm de algunas isoformas del receptor GABA_A, los años que el paciente ha estado bajo tratamiento farmacológico. En el caso del hipocampo, donde solo se pudo establecer una correlación entre la isoforma alfa 1, la línea de tendencia nos indica que entre mayor tiempo de tratamiento, la expresión del RNAm aumenta; aunque la dispersión de los datos, nos muestran que el mayor efecto sobre la expresión ocurre durante los primeros años de tratamiento. En corteza, las isoformas que correlacionaron con esta patofisiología fueron, alfa 1, alfa 4, alfa 6, gamma 1 y gamma 2. Estas isoformas del receptor, se vieron afectadas de manera negativa por los años de tratamiento; es decir, la expresión del RNAm de cada una de ellas disminuyó.

Estos hallazgos en conjunto con los niveles altos de RNAm encontrados en los tejidos epilépticos estudiados (figura 10, 15 y 17), apoyan la hipótesis de que la exposición prolongada a DAEs, induce una reducción en las interacciones alostéricas entre GABA y los sitios de unión a BZD en el receptor GABA_A. (Friedman y cols., 1969, Hutchinson y cols., 1996). También se ha observado, que la epilepsia puede alterar la función del receptor GABA_A, incrementando la expresión de la isoforma alfa 3 y disminuyendo la expresión de las isoformas alfa 1 y alfa 2 (Kamphius y cols., 1995 y White y Gurley, 1995); así como, aumentando la expresión de la isoforma gamma 2 (Kamphius y cols., 1995). Además, el

acoplamiento alostérico de GABA y el sitio de unión a BZD, es alterado por el tratamiento a largo plazo con barbitúricos (Ito y cols., 1996). Lo que genera un rearrreglo estequiométrico del receptor GABA_A que afecta los sitios de unión alostéricos del receptor, lo que produce insensibilidad del mismo para las DAEs (Macdonald y Olsen, 1994). Lo cual nos sugiere que la exposición prolongada a las DAEs por parte de los blancos terapéuticos, genera un desequilibrio en la expresión del RNAm de las subunidades del receptor GABA_A, que provoca cambios en el ensamblaje del receptor afectando su funcionalidad.

A)

Hipocampo



B)

Corteza

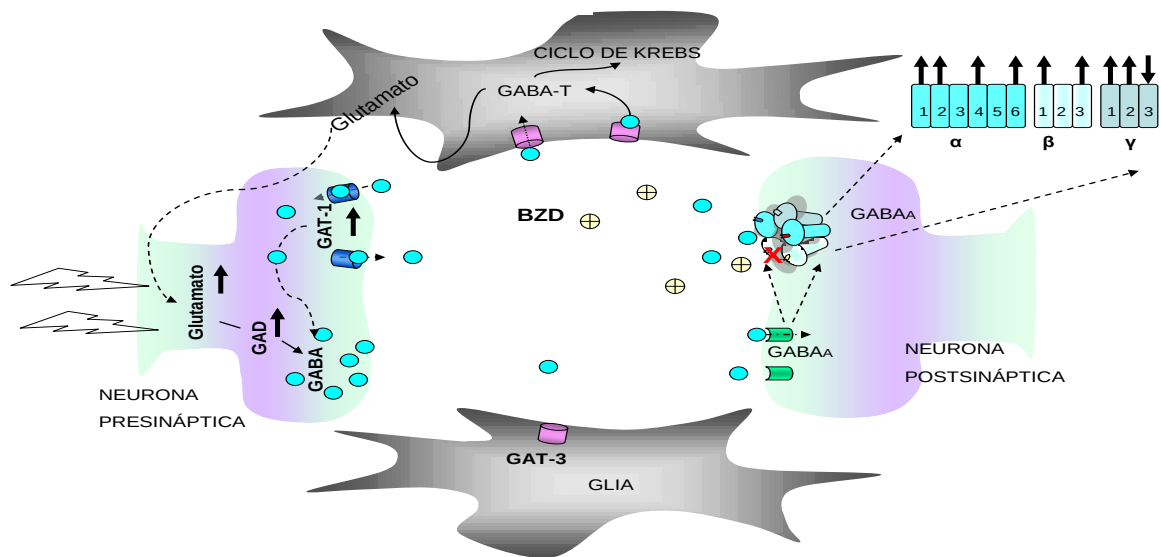


Figura 23. Modificaciones significativas en la expresión del RNAm en los componentes de la neurotransmisión GABAérgica. A) en hipocampo. B) en corteza. GABA ● Subunidad alfa ■ Subunidad beta □ Subunidad gamma ■. GABA_A, receptor GABA_A; GAD, glutamato descarboxilasa; GAT-1, transportador de GABA 1; GAT-3, transportador de GABA 3; BZD, benzodiazepinas ⊕; GABA-T, GABA transaminasa; ↑ aumento; ↓ disminución.

XIII. Conclusiones.

Las condiciones fisiopatológicas de la ERTRAFAR, están alterando la expresión del RNAm de los transportadores, la enzima sintetizadora y las isoformas del receptor de GABA.

En el presente estudio los resultados sugieren que la ERTRAFAR, disminuye la expresión del RNAm de GAT-3 en hipocampo (figura 19A), esto muy probablemente, puede estar relacionado con la disminución en la concentración de GABA intracelular, observado en pacientes con ERTRAFAR. Por otro lado, la sobre expresión del RNAm de GAT-1 en corteza (figura 19B), nos habla de la gran actividad neuronal generada en esta región y de un mecanismo compensatorio que intenta contrarrestar la excitabilidad neuronal en la zona de propagación, liberando GABA por inversión del transportador.

El aumento en la expresión del RNAm de GAD 67 en hipocampo (figura 23A), nos sugieren un posible mecanismo por el cual las interneuronas que han logrado sobrevivir a la gran pérdida neuronal que se presenta en los pacientes con ERTRAFAR y esclerosis hipocampal, tratan de revertir la hiperexcitabilidad neuronal; así como, la sincronización anormal que se genera por la presencia de crisis epilépticas, sintetizando más GABA.

Los cambios observados en los niveles de expresión del RNAm de los transportadores y de GAD 67 (figura 23) sugiere la activación de un sistema de retroalimentación entre la neurona presináptica y postsináptica, enviando señales para que se active el gen de GAD 67 e iniciar la síntesis de la enzima y aumentar la producción de GABA y poder restablecer la homeostasis del sistema nervioso central.

Nuestros resultados sugieren que los cambios traduccionales (expresión del RNAm) en hipocampo (figura 23A), son generados, probablemente, por las condiciones fisiopatológicas de la ERTRAFAR, y esto puede estar afectando la estequiometría del receptor GABA_A; es decir, generando un desequilibrio estructural debido a las modificaciones en el ensamblaje del receptor, esto alteraría la función al disminuir la sensibilidad de reconocimiento a sus ligandos, debido a que, muy probablemente, las modificaciones estén alterando los sitios de unión de GABA y sus agonistas del mismo (benzodiazepinas y barbitúricos). Por otro lado, la sobreexpresión en corteza (figura 23B) puede deberse a un mecanismo compensatorio para evitar la propagación de las crisis epilépticas y al mismo tiempo generar neuroprotección en corteza, y así reducir el daño neuronal severo, como el observado en hipocampo en pacientes con esclerosis hipocampal.

Por último, nuestros resultados muestran la existencia de una correlación entre las condiciones fisiopatológicas que suceden durante la ERTRAFAR (tabla 1); así como, el efecto que tiene la administración prolongada de DAEs en los

pacientes; y, los cambios en la expresión del RNAm de las subunidades que conforman el receptor GABA_A. Lo que sugiere, que la refractariedad en los pacientes con ELT se incrementa por el tiempo de tratamientos farmacológico, el cual modifica probablemente la expresión de los genes que codifican para cada una de las subunidades que conforman el receptor GABA_A.

XIV. Perspectivas.

Para corroborar que los cambios observados en la expresión del RNAm, por efecto de las condiciones fisiopatológicas de la ERTRAFAR, pueden estar alterando la síntesis de proteínas, es necesario realizar estudios que permitan medir los niveles de expresión de proteínas; así como, estudiar la funcionalidad del receptor. Por otro lado, es necesario conocer las modificaciones que la ERTRAFAR produce en el receptor metabotrópico GABA_B, el cual tiene una importante participación en la función inhibitoria de GABA.

XV. Bibliografía.

Aparicio-Meix JM. Mecanismo de acción de los fármacos antiepilépticos. En Tratamiento de la Epilepsia. Editado por: Francisco Villarejo. Ediciones Díaz de Santos, 1998. pp. 43-55.

Ben-Ari Y. 1985. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14: 375-403.

Bear J., Fountain NB., Lothman EW. 1996. Responses of the superficial entorhinal cortex in vitro slices from naïve and chronically epileptic rat. *J Neurophysiol.* 76: 2928-2940.

Borden LA. 1996. GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochem Znt.* 29:335-56.

Bormann J. 1988. Electrophysiology of GABA_A y GABA_B receptor subtypes. *Trends Neurosci.* 11: 112-116.

Brooks-Kayal AR., Shumate RD., Jin H., Rikhter TY., Coulter DA. 1998. Selective changes in single cell GABA_A receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nature Medicine.* 4, 1166-1172.

Brown TR., Holmes GL. 2001. Epilepsy. *N Engl J Med.* 344:1145-1151.

Bureau MH., Olsen RW. 1993. GABA_A receptor subtypes: ligand binding heterogeneity demonstrated by photoaffinity labeling and autoradiography. *J. Neurochem.* 61: 1479-1491.

Burò D., Kamatchi G. 1991. GABAA receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB J.* 5:2916-2923.

Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia.* 1981; 22:489–501.

Conti F., Minelli A., Melone M. 2004. GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Res Rev.* 45(3):196-212.

Contreras D. 2000. Modelos experimentales en epilepsia. *Rev Neurol* 30(4): 370-376.

Crespel A., Rigau V., Coubes P., Rousset MC., de Bock F., Okano H. 2005. Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* 19: 436-50.

Du F., Whetsell Jr WO., Abou-Khalil B., Blumenkopf B., Lothman EW., Schwarcz R. 1993. Preferential neuronal loss in layer III of the entorhinal cortex in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 16: 223-233.

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

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

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

Ebner A. Preoperative evaluation in epilepsy surgery: some principal considerations. In: Lüders HO, Comair YG eds. Epilepsy surgery. Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins; 2001, p 177-183.

Eid T. Schwarcz R., Pttersen Op. 1999. Ultrastructure and immunocytochemical distribution of GABA layer III of the rat medial entorhinal cortex following aminooxyacetic acid-induced seizures. *Exp Brain Res.* 125: 463-475.

Engel JR. 1996 .Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 26: 141-150.

Erlander M., Tillakaratne NF., Feldum S., Patel N., Tobin A. 1991. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron.* 7: 91-100.

Esclapez M., Houser CR. 1999. Up-regulation of GAD65 and GAD67 in remaining hippocampal GABA neurons in a model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol.* 412(3): 488-505.

Farrant M., Nusser Z. 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABAA receptors. *Nat Rev Neurosci.* 6:215–229.

Fisher PD., Sperber EF., Moshe SL. 1998 Hippocampal sclerosis revisited. *Brain Dev.* 20: 563-573.

Flores J, y Pazos A. Neurotransmisión en el sistema nervioso central. En *Farmacología Humana*. Editado por Jesús Flores, Juan Antonio Armiño y África Mediavilla. Ed. Masson. España, 4ª edición. 2004. pp. 435-459.

Freichel C., Potschka H., Ebert U., Brandt C., Löscher W. 2006. Acute changes in the neuronal expression of GABA and glutamate decarboxylase isoforms in the rat piriform cortex following status epilepticus. *Neuroscience.* 141(4):2177-94.

Friedman LK., Gibbs TT., Farb DH. 1969. γ -Aminobutyric acid A receptor regulation: heterologous uncoupling of modulatory site interactions induced by chronic steroid, barbiture, benzodiazepine, or GABA treatment in culture. *Brain Res.* 707: 100-109.

García-Contreras F, Constantino-Casas P, Castro-Ríos A, Nevárez-Sida A, Estrada Correa Gdel C., Carlos Rivera F., Guzmán-Caniupan J., Torres-Arreola Ldel P, Contreras-Hernández I., Mould-Quevedo J., Garduño-Espinosa J. 2006. Direct medical costs for partial refractory epilepsy in Mexico. *Arch Med Res.* 37(3):376-83.

Dawson GR., Collinson N., Atack R. 2005. Development of subtype selective GABAA modulators. *CNS Spectr.* 10(1): 21-27.

Hirao T., Morimoto K., Yamamoto Y., Watanabe T., Sato H., Sato K., Sato S., Yamada N., Tanaka K., Suwaki H. 1998. Time-dependent and regional expression of GABA transporter mRNAs following amygdala-kindled seizures in rats. *Bruin Res Mol Bruin Res.* 54:49-5s.

Holmes GL. 2004. Epidemiology and clinical mechanisms of drug resistance in epilepsy: new horizons in the development of antiepileptic drugs: the search for new targets: a conference review. *Epilepsy Res.* 60: 96-97.

Holtkamp M., Othman J., Buchheim K., Masuhr F., Scheielke E., Meierkord II. 2005. Predietors and prognosis of refractory status epilepticus treated in a neurosurgical intensive care unit. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 76: 534-539.

Hutchinson MA., Smith PF., Darlington CL. 1996. The behavioral and neural effects of the chronic administration of benzodiazepine anxiolytic and hypnotic drugs. *Prog Neurobiol.* 49: 73-97.

Inoue K., Morimoto K., Sato K., Yamada N., Otsuki S. 1992. Mechanisms in the development of limbic status epilepticus and hippocampal neuron loss: an experimental study in a model of status epilepticus induced by kindling-like electrical stimulation of the deep prepyriform cortex in rats. *Acta Med. Okayama.* 46:129–139.

Kamphuis W., De Rijk TC., Lopes Da Silva FH. 1995. Expression of GABAA receptor subunit mRNAs in hippocampal pyramidal and granular neurons in the kindling model of epileptogenesis: an in situ hybridization study. *Mol. Brain Res.* 31: 33–47.

Kaufman DL., Houser CR., Tobin AJ. 1991. Two forms of the GABA synthetic enzyme glutamate decarboxylase have a distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J. Neurochem.* 56: 720-723.

Kralic JE., O'Buckley TK., Khisti RT., Hodge CW., Homanics GE., Morrow AL. 2002. GABA_A receptor alpha-1 subunit deletion alters receptor subtype assembly, pharmacological and behavioral responses to benzodiazepines and zolpidem. *Neuropharmacol.* 43, 685-694.

Kwan P., Brodie M. 2002. Refractory epilepsy: a progressive, intractable but preventable condition? *Seizure.* 11: 77-84.

Lai CT., Tanay VAMI, Charrois GJR., Baker GB., Bateson AN. 1998. Effects of phenelzine and imipramine on the steady-state levels of mRNAs that encode glutamic acid decarboxylase (GAD67 and GAD65), the GABA transporter GAT-I and GABA transaminase in rat cortex. *Nuunyn Schmiedebergs Arch Phurmucol.* 357:32-8.

Lee TS., Bjornsen LP., Paz C., Kim JH., Spencer DD., Eid T., de Lanerolle NC. 2006. GAT1 and GAT3 expression are differently localized in the human epileptogenic hippocampus. *Acta Neuropathol.* 111(4): 351-63.

Lorigados Pedre L., Orozco Suárez S., Morales Chacón L., García Maeso I., Estupiñán Díaz B., Bender del Busto JE., Pavón Fuentes N., Paula Piñero B., Rocha Arrieta L. 2008. Muerte neuronal en la neocorteza de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal resistente a fármacos. *Neurologia.* 23(9):555-65.

Löscher W., Lehmann H., Ebert U. 1998. Differences in the distribution of GABA- and GAD-immunoreactive neurons in the anterior and posterior piriform cortex of rats. *Brain Res.* 800: 21–31.

Löscher W., Schmidt D. 2001. New horizons in the development of antiepileptic drugs: the search for new targets. *Epilepsy Res.* 60: 77-159.

Löscher W., Potschka H. 2002. Role of Multidrug Transporters in Pharmacoresistance to Antiepileptic Drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 301: 7-14.

Löscher W., Potschka H. 2005. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci.* 6(8): 591-602.

Löscher W., Schmidt D. 2006. Experimental and clinical evidence for loss of effect (Tolerance) during prolonged treatment with antiepileptic drugs. *Epilepsia.* 47(8); 1253-1284.

Lothman EW. Basic mechanisms of seizure spread. 1996. *Epilepsy Res suppl.* 11: 9-16.

Luddens H., Wisden W. 1991. Function and pharmacology of multiple GABAA receptor subunits. *Trends Pharmacol Sci* 12:49 –51.

Lup F., Picard F., Yonekawa Y., Wieser HG., Fritschy JM. 2009 Selective changes in GABAA receptor subtypes in white matter neurons of patients with focal epilepsy. *Brain* Jul 2. [Epub ahead of print].

MacDonald RW. y Olsen R. GABAA receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 569–602.

Marco P., Sola RG., Pulido P., Alijarde MT., Sánchez A., Ramón y Cajal S., De Felipe J. 1996. Inhibitory neurons in the human epileptogenic temporal neocortex. An immunocytochemical study. *Brain.* 119: 1327-47.

Martin DL., Rinvall K. 1993. Regulation of γ -Aminobutyric acid synthesis in the brain. *J. Neurochem.* 60: 395-407.

Mathern GW, Mendoza D., Lozada A., Pretorius JK., Dehnes Y., Danbolt NC., Nelson N., Leite JP., Chimelli L., Born DE., Sakamoto AC., Assirati JA., Fried I., Peacock WJ., Ojemann GA., Adelson PD. 1999. Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology.* 52(3): 453-72.

Mathews GC., Bolos-Sy AM., Covey DF., Rothman SM., Ferrendelli JA. 1996. Physiological comparison of alpha-ethyl-alpha-methyl-gamma-thiobutyrolactone with benzodiazepine and barbiturate modulators of GABAA receptors. *Neuropharmacology.* 35: 123–136.

McGeer PL., McGeer EG. Amino acid neurotransmitters. En: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB, editores. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects* (4ª ed). Nueva York: Raven Press, 1989; 311-332.

- McIntyre DC., Plant JR. 1989. Pyriform cortex involvement in kindling. *Neurosci Biobehav Rev* 13:277–280.
- McNamara JO.1992. The neurobiological basis of epilepsy. *Trends Neurosci.* 15:357-359.
- McNamara J. 1994. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J. Neurosci.* 14 (6): 3413-3425.
- Meldrum BS. y Chapman AG. 1999. Basic mechanisms of Gabitril (Tiagabine) and future potential developments. *Epilepsia.* 40 (suppl. 9) S2-S6.
- Millar JW., Kleven DT., Domin BA., Fremeau RT. Cloned sodium-(and chloride) dependent high-affinity transporters for GABA, glycine, proline, betaine, taurine, and creatine. In Reith MEA, ed. *Neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation.* Totowa, NJ: Humana Press. 1997: 101-150.
- Möhler H., Fritschy JM., Rudolph U., 2002. A new benzodiazepine pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300: 2–8.
- Morimoto K., Fahnestock M., Racine RJ. 2004. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol.* 73: 1-60.
- National Association of Epilepsy Center. 1990. Recommended guide-lines for the diagnosis and treatment in specialized epilepsy center. *Epilepsia.* 31 (ss 1): S1-S12.
- Neder L., Valente V., Carlotti CG Jr., Leite JP., Assirati JA., Paçó-Larson ML., Moreira JE. 2002. Glutamate NMDA receptor subunit R1 and GAD mRNA expression in human temporal lobe epilepsy. *Cell Mol Neurobiol.* 2002 Dec; 22(5-6):689-98.
- Nishimura T., Schwarzer C., Gasser E., Kato N., Vezzani A., Sperk G. 2005. Altered

expression of gabaa and gabab receptor subunit mRNAs in the hippocampus after kindling and electrically induced status epilepticus. *Neuroscience* 134: 691–704.

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

Olson RW., DeLorey TM. GABA and Glycine. En: *Basic Neurochemistry molecular, cellular and medical aspects*. 6a edición. Editado por Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Fisher S.K. y Uhler M.D. Lippincott-Raven. Estados unidos 1999. pp. 335-346.

Olsen RW., DeLorey TM., Gordey M., Kang MH. GABA receptor function and epilepsy. In Delgado-Escueta AV, Wilson WA, Olsen RW, Porter RJ, eds. *Jasper's basic mechanisms of the epilepsies*. *Advances in neurology*. Vol.79. 3ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1999. p. 499-510.

Olsen RW. 2002. Phenobarbital and other barbiturates, In: Levy, R.H., Mattson, R.H., Meldrum, B.S., Perucca, E. (Eds.), *Antiepileptic Drugs*, Fifth edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp. 489–495.

Pellegrini-Giampietro DE., Gorter JA., Bennett MV., Zukin RS. 1997. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca (2+)-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci*. 20 (10): 464-70. Review.

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

Pirker S., Schwarzer C., Czech T., Baumgartner C., Pockberger H., Maier H., Hauer B., Sieghart W., Furtinger S., Sperk G. 2003. Increased expression of GABA (A) receptor beta-subunits in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 62(8):820-34.

- Prasad A., Worrall BB., Bertram EH. 2001. Propofol and midazolam in the treatment of refractory status epilepticus. *Epilepsia*. 42: 380-386.
- Pritchett D., Luddens H., Seeburg P. 1989. Type I and type II GABAA benzodiazepine receptor produced in transfected cells. *Science*. 245: 1389 -1392.
- Programa prioritario de Epilepsia. 2001. Lineamientos para el tratamiento de la epilepsia. SSA, Academia Mexicana de Neurología, OMS, CAMELICE.
- Puia G., Vicini S., Seeburg P., Costa E. 1991. Influence of recombinant g-aminobutyric acid_A receptor subunit compositions on the action of allosteric modulators of g-aminobutyric acid-gated Cl₂ currents. *Mol Pharmacol* 39: 691- 696.
- Purves D., Augustine GJ., Fitzpatrick D., Katz LC., Lamantia AS., McNamara JO. Plasticidad del sistema nervioso en el adulto. En: *Invitación a la Neurociencia*. Editorial Médica Panamericana, 2001. pp 477-502.
- Radian R., Ottersen OP., Storm-Mathisen J., Castel M., Kanner BI. 1990. Immunocytochemical localization of the GABA transporter in rat brain. *J Neurosci*. 10: 1319-1330.
- Regesta G., Tanganelli P. 1999. Clinical aspects and biological bases of drug resistant epilepsies. *Epilepsy Res*. 34; 109-122.
- Rempe DA., Bertram EH., Williamson JM., LothmanEW. 1997. Interneurons in area CA1 stratum radiatum and stratum oriens remain functionally connected to excitatory synaptic input in chronically epileptic animals. *J Neurophysiol* 45; 1504–1515.
- Remy S., Beck H. 2006. Molecular and cellular mechanics of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain* 129; 18-35.

- Ribak CE., Tong WMY., Brecha NC. 1996. GABA plasma membrane transporters, GAT-1 and GAT-3, display different distributions in the rat hippocampus. *J Comp Neurol.* 367: 595-606.
- Rogawski MA., Löscher W. 2004. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci.* 5: 553-564.
- Sander JW. 1993. Some aspects of prognosis in the epilepsies: A review. *Epilepsia.* 34: 1007-1016.
- Sanjay S. Kumar y Paul S. Buckmaster. 2006. Hyperexcitability, Interneurons, and Loss of GABAergic Synapses in Entorhinal Cortex in a Model of Temporal Lobe Epilepsy. *J. Neurosci.* 26(17):4613– 4623.
- Saxena N., Macdonald R. 1994. Assembly of GABA receptor subunits: role of the δ -subunit. *J Neurosci* 14: 7077-7086.
- Sayin U., Osting S., Hagen J., Rutecki P., Sutula T. 2003. Spontaneous seizures and loss of axo-axonic and axo-somatic inhibition induced by repeated brief seizures in kindled rats. *J Neurosci.* 23: 2759-68.
- Schmidt D., Löscher W. 2005. Drug resistance in epilepsy: Putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia.* 46(6): 858-877.
- Schwarzer C., Tsunashima K., Wanzenböck C., Fuchs K., Sieghart W., Sperk G. 1997. GABA (A) receptor subunits in the rat hippocampus II: altered distribution in kainic acid-induced temporal lobe epilepsy. *Neurosci.* 80, 1001-1017.
- Schwob JE., Fuller T., Price JL., Olney JW. 1980. Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neuroscience* 5: 991–1014.

Semah F., Picot MC., Adam C., Broglin D., Arzimanoglou A., Bazin B., Calvalcanti D., Baulac M. 1998. Is the underlying cause of epilepsy a major prognosis factor for recurrence? *Neurology*. 51: 1256-1262.

Sieghart W. 2000. Structure and pharmacology of γ -aminobutyric acid A receptor subtypes. *Pharmacol. Rev.* 47: 181-243.

Sieghart W., Sperk G. 2002. Subunit composition, distribution and function of GABA A receptor subtypes. *Curr Top Med Chem*. 2: 795-816.

Sisodiya SM., Lin WR., Harding BN., and Squier MV., Thom M. 2002. Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain*. 125: 22-31.

Sloviter RS. 1991. Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: "the Dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 1: 41-61.

Soghomonian J., Martin DL. 1998. Two isoforms of glutamate decarboxylase: Why trends *Pharmacol Sci*.19: 500-506.

Sperk G., Schwarzer C., Tsunashima K., Kandlhofer S. 1998. Expression of GABA (A) receptor subunits in the hippocampus of the rat after kainic acid-induced seizures. *Epilepsy Res*. 32 (1-2): 129-39.

Sperk G., Schwarzer C., Heilmann J., Frittinger S., Reimer RJ., Edwards RH., Nelson N. 2003. Expression of plasma membrane GABA A transporters but not of the vesicular GABA transporters in the dentate granule cells after kainic acid seizures. *Hippocampus* 13(7): 806-815.

- Sutula TP. 1990. Experimental models of temporal lobe epilepsy: new insights from study kindling and synaptic reorganization. *Epilepsia*. 31 (ss 3): S45-S54.
- Sutula TP., Cavazos JE., Woodard AR. 1994. Long term structural and functional alterations induced in the hippocampus by kindling: implications for memory dysfunction and development epilepsy. *Hippocampus*. 4(3): 254-258.
- Tasker JG., Dudek F. 1991. Electrophysiology of GABA-mediated synaptic transmission and possible roles in epilepsy. *Neurochem Res*. 16(3): 251-262.
- Thomas PM., Phillips JP., O'Connor WT. 2004. Hippocampal microdialysis during spontaneous intraoperative epileptiform activity. *Acta Neurochir (Wien)*. 146(2): 143-51.
- Thomas PM., Phillips JP., O'Connor WT. 2005. Microdialysis of the lateral and medial temporal lobe during temporal lobe epilepsy surgery. *Surg Neurol*. 63(1): 70-79.
- Thompson SA., Whiting PJ., Wafford KA. 1996. Barbiturate interactions at the human GABAA receptor: dependence on receptor subunit combination. *Br. J. Pharmacol*. 117: 521-527.
- Treiman DM. 2001. GABAergic mechanism in epilepsy. *Epilepsia*. 42 (Supply. 3): 8-12.
- Tsunashima K., Schwarzer C., Kirchmair E., Sieghart W., Sperk G. 1997. GABA A receptor subunits in the rat hippocampus III: altered messenger RNA expression in kainic acid-induced epilepsy. *Neuroscience*. 80(4): 1019-1032.
- Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Tursk L. 1983. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 9: 315-35.

- Upton N. y Blackburn T. Pharmacology of mammalian GABA_A receptors. En: The GABA Receptors, second edition. Editado por Enna S.J. y Bowery. Humana Press. Totowa, New Jersey. 1997. pp. 83-120.
- Vreugdenhil M., van Veelen CW., van Rijen PC., Lopes da Silva FH., Wadman WJ. 1998. Effect of valproic acid on sodium currents in cortical neurons from patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 32: 309-320.
- Vreugdenhil M., Wadman WJ. 1999. Modulation of sodium currents in rat CA1 neurons by carbamazepine and valproate after kindling epileptogenesis. *Epilepsia.* 40: 1512-1522.
- Wang XJ., Buzsaki G. 1996. Gamma oscillation by synaptic inhibition in hippocampal interneuronal network model. *J Neurosci.* 16: 6402-6413.
- White G. y Gurley DA. 1995. α Subunits influence Zn block of γ 2 containing GABA_A receptor currents. *Neuroreport.* 6: 461-464.
- Williamson A., Telfeian AE., Spencer DD. 1995 Prolonged GABA responses in dentate granule cells in slices isolated from patients with temporal lobe sclerosis. *J Neurophysiol.* 74: 378-387.
- Wisden W., Herb A., Wieland H., Keinänen K., Luddens H., Seeburg P. 1991. Cloning, pharmacological characteristics, and expression pattern of the rat GABA_A receptor subunit. *FEBS Lett* 289: 227-230.
- Wong GT., Bottiglieri T., Carter S. 2003. GABA, γ -Hydroxybutyric acid and neurological disease. *Ann neurol.* 54 (suppl 6): S3-S12.
- Wu J. 1985. Two forms of rat brain glutamic acid decarboxylase differ in their dependence of free pyridoxal phosphate. *J. Neurochem.* 44: 957-965.

Wu J., Denner L., Wei S., Lin C., Song G., Xu Y., Liu J., Lin H. 1986. Production and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies to rat brain L-glutamate decarboxylase Brain Res. 373: 1-14.

Ymer S., Draguhn A., Wisden W., Werner P., Keinänen K., Schofield P., Sprengel R., Pritchett D., Seeburg P. 1990. Structural and functional characterization of the $\alpha 1$ -subunit of GABA_A/benzodiazepine receptors. EMBO J 9: 3261-3267.

Anexos.

Anexo I. Condiciones de amplificación para cada uno de los genes.

GEN	Temperatura de alineamiento	Tiempo de hibridación	Tiempo de extensión (72°C)	[MgCl ₂] mM	Número de ciclos
B-ACT	58°C	20 seg	30 seg	1.0	30
GAT-1	55°C	30 seg	40 seg	1.4	35
GAT-3	54°C	30 seg	40 seg	1.75	35
GAD-67	55°C	30 seg	40 seg	1.5	35
ALFA-1	55°C	30 seg	40 seg	1.75	35
ALFA-2	58°C	30 seg	40 seg	1.75	35
ALFA-3	58°C	30 seg	40 seg	1.75	35
ALFA-4	55°C	30 seg	40 seg	1.75	35
ALFA-5	56°C	30 seg	40 seg	1.75	35
ALFA-6	54°C	30 seg	40 seg	1.75	35
BETA-1	55°C	30 seg	40 seg	1.75	35
BETA-2	55°C	30 seg	40 seg	1.75	35
BETA-3	56°C	30 seg	40 seg	1.75	35
GAMMA-1	55°C	30 seg	40 seg	1.75	35
GAMMA-2	55°C	30 seg	40 seg	1.75	35
GAMMA-3	58°C	30 seg	40 seg	1.5	35

Anexo II Secuencias iniciadoras utilizadas en los ensayos de PCR para los diferentes genes.

Primer	Pares de bases	Pares de bases (pb) amplificadas	Región de amplificación
FW GAT-1	GACGACCTCGACTTTGAGCA		
RV GAT-1	TTCATTCTCCTCGTACAGGCA	384	458-842
FW GAT-3	CCTGTTTTTTTCCTGGAGACA		
RV GAT-3	TCGCAGTCACGTATACAACCT	472	338-809
FW GAD-67	TCCATAAAGAAAGCTGGGGCT	483	1299-1781
RV GAD-67	AATTGCCTTGTCCTCCCGGT		
FW ALFA-1	ATGGACAGCCGTCATTACAA	474	545-1018
RV ALFA-1	ATTTTAGTGGGCAAGCATGG		
FW ALFA-2	ACGATAATCGGCTTAGACCAG	487	473-959
RV ALFA-2	AACCTAGAGCCATCAGGAGCA		
FW ALFA-3	AACAAGCTGCTCAGATTGGTG	343	742-1084
RV ALFA-3	TCTGGATCACAAAGTAGCCAA		
FW ALFA-4	AGGAGGAGAAATTGTGCACAG	406	255-660
RV ALFA-4	ATGGGACACTCCGCACTTAT		
FW ALFA-5	TGTTTTTCCGACAAAGCTGG	526	632-1157
RV ALFA-5	ATCACGGTCATTATGCAGGGA		
FW ALFA-6	AATGCAGAATGGAACCATTTT	455	752-1206
RV ALFA-6	CACTGATGCTCAAAGTGGTCA		
FW BETA-1	AATCGAGAGAGTCTGGGGCTT	346	390-735
RV BETA-1	TGTCTGGTACCCAGAGTTGGT		
FW BETA-2	TTCCACAGGTTCTATCCCA	408	890-1297

RV BETA-2	AATCTTGTTGACATCCAGGCG		
FW BETA-3	GGGTGTCCTTCTGGATCAATT	417	927-1343
RV BETA-3	GGATTCCTGAGTTGTCAAAGG		
FW GAMMA-1	CTTGGGTGTCTTTTTGGATCA	407	1015-1421
RV GAMMA-1	TCTGCAGTCTTCAAAGCAACA		
FW GAMMA-2	TGTTTATCAATGGAAGCGAAG	414	1012-1425
RV GAMMA-2	AAGGTGCCATACTCCACCAGA		
FW GAMMA-3	AACAGCATTAGGCATCACCA	342	1021-1362
RV GAMMA-3	TCCTGCCAGTAAACGGAATT		
FW β -ACT	TGGACTTCGAGCAAGAGATGG	478	746-1223
RV β -ACT	TCATAGTCCGCCTAGAAGCAT		